

# 気道平滑筋の電気生理学的検討 -膜の電気現象と収縮との関係および電気現象に及ぼす細胞内のCa<sup>[2+]</sup>動員の機序について

著者	奈良 正之
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54802">http://hdl.handle.net/10097/54802</a>

## 1. 要約

気道平滑筋は気管や気管支の収縮の維持にあずかる。博士論文の収録は気管支喘息の病態を特徴づけるものとして重要である。

本研究では、ウシとモルモットの気道平滑筋でパーサテラップ法を用いて、電気生理学的立場から収縮能と収縮という関係が成り立つのか、収縮の収縮物質を用いて収縮と膜電位の関係を検討した。また、時に観察される自発性の一過性の外向き電流 (spontaneous transient outward currents: STOCs) から、膜の電気的現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序、加

## 気道平滑筋の電気生理学的検討

一膜の電気現象と収縮との関係および膜の電気現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序について一

STOCsによる収縮を引き起こす機序を示した。従って、収縮能と収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきであると考えられた。また、BTを、それだけでは直接収縮しない低濃度で処理しておく、処理しない場合に比べてHAによる収縮は増強した。

STOCsは、今までの報告にも見られる様に、大きなコンダクタンスをもち、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のある $\text{K}^{+}$ チャネル ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャネル) を介した $\text{K}^{+}$ 電流であり、細胞内からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出により活性化されることが示された。イノシトール1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate: IP<sub>3</sub>) を細胞内に投与するとSTOCsは顕著に増われ、STOCsは平滑筋内で生成されたIP<sub>3</sub>を介した細胞内プールからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出により生じると考えられた。収縮をおこすACH、カルバコール (CCQ)、HA、弛緩をおこすカフェインはいずれもSTOCsを一時的にでも活性化した。従って、STOCsを生じる $\text{K}^{+}$ を介した $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、収縮、弛緩とは直接関係ないものと考えられた。

ウシ、モルモット

東北大学大学院医学系研究科内科学系専攻  
(内科学第一講座)

奈良正之



## 要約

博士論文

気道平滑筋は気管や気管支の蠕動の維持にあずかる。この蠕動は気管支樹全体の病態を特徴づけるものとして重要である。

本研究では、ウシとラットのアリゲル平滑筋でパッチクランプ法を用いて、電気生理学的立場から、膜分極-収縮という関係が成り立つのか、膜の収縮物質を用いて収縮と膜電位の関係を検討した。また、時に観察される自発性の一過性の外向き電流 (spontaneous transient outward currents: STOCs) から、膜の電気的現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序について検討した。

## 気道平滑筋の電気生理学的検討

一膜の電気現象と収縮との関係および膜の電気現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序について一

BTX/HAによる膜分極の抑制と収縮の抑制との関係を調べた。従って、膜分極-収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきであると考えられた。また、BTXを、それだけでは直接収縮しない低濃度で処理しておくと、処理しない場合に比べてHAによる収縮は増強した。

STOCsは、今までの報告にも見られる様に、大きなコンダクタンスをもち、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のある $\text{K}^{+}$ チャネル ( $\text{K}^{+}$ チャネル) を介した $\text{K}^{+}$ 電流であり、細胞内からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出により活性化されることが示された。イノシトール1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate: IP<sub>3</sub>) を細胞内に投与するとSTOCsは顕著に現われ、STOCsは平滑筋内で生成されたIP<sub>3</sub>を介した細胞内プールからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出により生じると考えられた。収縮を誘発するACH、カルバコール (CCh)、HA、他殺をおこすカフェインはいずれもSTOCsを一時的にでも活性化した。従って、STOCsを生じる膜を介した $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、収縮、弛緩とは直接関係ないものと考えられた。

東北大学大学院医学系研究科内科学系専攻  
(内科学第一講座)

奈良正之



## 1. 要約

気道平滑筋は気管や気管支の構造の維持にあずかるとともに、その収縮は気管支喘息の病態を特徴づけるものとして重要である。

本研究では、ウシとモルモットの気管平滑筋でパッチクランプ法を用いて、電気生理学的立場から脱分極-収縮という関係が成り立つのか、種々の収縮物質を用いて収縮と膜電位の関係を検討した。また、時に観察される自発性の一過性の外向き電流 (spontaneous transient outward currents: STOCs) から、膜の電氣的現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序、加えて収縮と細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の関係について検討した。

気道平滑筋の収縮物質であるテトラエチルアンモニウム (TEA)、アセチルコリン (ACh)、ヒスタミン (HA)、エンドセリン (ET) は、TEA、AChが膜を脱分極させるのに対し、HA、ETは膜を過分極させ、ETはHAによる膜過分極をさらに増強させる傾向を示した。従って、脱分極-収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきであると考えられた。また、ETを、それだけでは直接収縮しない低濃度で処理しておく、処理しない場合に比べてHAによる収縮は増強した。

STOCsは、今までの報告にも見られる様に、大きなコンダクタンスをもち、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のある $\text{K}^{+}$ チャネル ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャネル) を介した $\text{K}^{+}$ 電流であり、細胞内からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出により活性化されることが示された。イノシトール1,4,5-三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate:  $\text{IP}_3$ ) を細胞内に投与するとSTOCsは顕著に現われ、STOCsは平滑筋内で生成された $\text{IP}_3$ を介した細胞内プールからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出により生じると考えられた。収縮をおこすACh、カルバコール (CCh)、HA、弛緩をおこすカフェインはいずれもSTOCsを一時的にでも活性化した。従って、STOCsを生じる $\text{IP}_3$ を介した $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、収縮、弛緩とは直接関係ないものと考えられた。ウシ、モルモットの気道平滑筋では、収縮には主として細胞外からの流入による $\text{Ca}^{2+}$ が関与していると考えられた。



## 2. 研究背景

### 1. 平滑筋

筋は、その筋線維の形態によって分類されるが、平滑筋は規則的な縞模様（横紋）のない筋細胞全てを指す。瞳孔括約筋と瞳孔散大筋が外胚葉由来である以外は全て中胚葉由来である<sup>1</sup>。

平滑筋は呼吸器（気管、気管支）、消化器（胃、腸など）、泌尿器（尿管、膀胱）、生殖器（子宮、精嚢腺など）、血管（動脈、静脈）など、機能の全く異なる内臓器官に広く分布し、その構造の維持と収縮とにあずかっている<sup>1</sup>。この分布の広さに対応して、また、動物の種に対応して、平滑筋細胞の興奮性やアゴニストに対する反応性も多様である。例えば、細胞膜の興奮性について図1のごとく大きく3つに分けることができる<sup>2</sup>。また、ウサギの動脈平滑筋を収縮させるノルアドレナリンは<sup>8</sup>、モルモットの気管平滑筋を弛緩させる<sup>3</sup>。一方、モルモットの門脈平滑筋を収縮させるカフェインは<sup>4</sup>気管平滑筋を弛緩させる<sup>11</sup>。この様に平滑筋は分布やアゴニストの刺激に対して多彩な特性を持つため、一般論が成り立ちにくい、逆にこの多彩性故に、多くの関心が注がれ、研究が行われてきた。

平滑筋の中で、気道平滑筋は気管や気管支の構造の維持にあずかるとともに、その収縮は気管支喘息の病態を特徴づけるものとして重要である。

図1に示すように、気道平滑筋は極めて興奮性の低いものとして分類される<sup>2</sup>。生理的条件下では刺激によっても"すべてか無の法則"に従うような活動電位を発生せず、これが"graded smooth muscle"と呼ばれる<sup>7</sup>由縁である。Alan等<sup>7</sup>の報告によればウシの気管平滑筋組織の中で、筋細胞成分は全体のおよそ57%で、筋の周囲にたくさんの膠原線維が長軸方向に沿って存在している。細胞長は約800 $\mu\text{m}$ 、細胞内の微細構造については、核とGolgi体が細胞の中心にあるのに対し、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ プールとして重要な筋形質小胞体(sarcoplasmic reticulum : SR)はしばしば細胞膜直下に見られると言う。

ただし、平滑筋の特性が多彩であるにもかかわらず、概して気道平滑筋に対する生理学的知見は乏しく、今なお、平滑筋に対する知識の多くは血管平滑筋や腸管平滑筋に由来するものである。

### 2. 平滑筋の機能



平滑筋の機能は機械的現象と電氣的現象に分けられる。すなわち、機械的現象とは収縮、弛緩を指し、電氣的現象とは膜の脱分極と過分極を指す。

## 2-1. 機械的現象

筋の収縮は細いフィラメント（アクチン）が太いフィラメント（ミオシン）の上を滑走することによって生じる<sup>5</sup>。

収縮のメカニズムは、平滑筋の場合、先ず $\text{Ca}^{2+}$ がカルモジュリンと結合する（図2）。従って、収縮の前提として細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]$ ）の上昇が必要となる。次に、結合してできた $\text{Ca}^{2+}$ -カルモジュリン複合体は、カルモジュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼ（ミオシンのリン酸化を触媒する酵素）を活性化する。この結果アクチンはミオシンの上を滑走し、収縮がおこる<sup>6</sup>（図2）。

平滑筋では、刺激に対する応答（収縮）のメカニズムは、細胞表面の膜電位に依存するもの（electromechanical coupling : EMC）と、依存しないもの（pharmacomechanical coupling : PMC）に分けられる<sup>8,9,10</sup>。イヌの気管平滑筋に、純粋な脱分極刺激に相当する高濃度の $\text{K}^+$ を投与すると収縮がおこる。この収縮は細胞外の $\text{Ca}^{2+}$ に依存し、膜上の電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを抑制する $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬によってほぼ完全に抑制される<sup>9</sup>。従って、EMCでは、膜の脱分極により電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが開き、細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ の流入があつて収縮がおこると考えられている<sup>9</sup>。一方、PMCでは、アゴニストの刺激によりG蛋白を介したphospholipase C (PLC)が関与してイノシトールリン脂質代謝がおこり<sup>12</sup>、その結果生じたイノシトール1,4,5-三リン酸（inositol 1,4,5-trisphosphate:  $\text{IP}_3$ ）がSRからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出を促し収縮すると考えられている<sup>10,13</sup>。しかし、平滑筋を収縮させる物質として代表的なコリン作働性刺激では、収縮に膜の脱分極が伴うことが知られている<sup>14,15</sup>。Coburnによれば、アセチルコリン

（ACh）の濃度を徐々に上昇させると張力の発生と同時に膜の脱分極がおこり、張力は大雑把に見て膜電位の変化に平行する<sup>14</sup>。アゴニストによる膜の脱分極は、純粋な脱分極刺激に伴う膜脱分極とは区別され、その正確な機序は未だ不明ではあるが<sup>14</sup>、この様に収縮物質が脱分極を伴い、また、弛緩物質が膜過分極を伴うことから<sup>3</sup>、収縮-膜脱分極、弛緩-膜過分極の関係がほぼ常識的に考えられてきた。しかし、最近の知見では、パッチクランプ法により、膜電位を固定した状態でAChを適用しても細胞が収縮すること<sup>24</sup>、ヒスタミン（HA）存在下で膜電位を過分極させると受容体依存性の $\text{Ca}^{2+}$ 流入が見られること<sup>25</sup>、また、モルモットやウシで、 $\beta$ -アドレノセプター刺激を与えると過分極を伴わずに弛緩



がおこる、との報告もあり<sup>26,27</sup>、収縮と脱分極、弛緩と過分極の関係は必ずしも一定ではない。

## 2-2. 電氣的現象

細胞膜にイオン濃度の異なる細胞外液と細胞内液が接しているため、膜を挟んで電位差が生じる。細胞外の電位を基準の零電位としたときの細胞内の電位が膜電位と呼ばれる<sup>16</sup>。平滑筋等の興奮性細胞では、その電氣的興奮性は脱分極させようとする内向き電流の大きさと、過分極あるいは再分極させようとする外向き電流の大きさの比率で決まる。

膜にはイオンを選択的に通過させるチャネルが存在し、そこをイオンが流れることにより電流が生じるが、パッチクランプ法を用いた検討によれば、気道平滑筋で最も多数存在するのは $K^+$ チャネルである<sup>1</sup>。 $K^+$ チャネルの抑制は脱分極を生じ、膜の興奮性を増す。一方、活性化は過分極を生じ、膜の興奮性を減じる。パッチクランプ法による解析によって数種類の $K^+$ チャネルが報告されている。研究の進んでいる動脈平滑筋では電位依存性 $K^+$ チャネル、 $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ チャネル、内向き整流性 $K^+$ チャネル、ATP依存性 $K^+$ チャネルの4種類の $K^+$ チャネルが報告されているが<sup>18</sup>、気道平滑筋で正確に確認されているものは大きなコンダクタンスを持つ $Ca^{2+}$ 依存性 $K^+$ チャネル ( $K_{Ca}$ )<sup>19,20,22</sup>と遅延整流性 $K^+$ チャネル ( $K_{DR}$ )<sup>20,21,22</sup>の2種類である。 $K_{Ca}$ チャネルは密度が高く<sup>1</sup>、電位依存性で細胞内の $Ca^{2+}$ に感受性を持つため、機能的に重視されてきた。 $K^+$ チャネル阻害薬の中で、低濃度 (1-10mM) のテトラエチルアンモニウム (TEA) により抑制されるが<sup>17,19,20,28</sup>、4-アミノピリジン (4-AP)、グリベングラマイドの影響を受けない<sup>20</sup>。このチャネルはごく生理的な条件下の膜電位、 $Ca^{2+}$ 濃度では開きにくく、その開率の上昇には高い膜電位、高濃度の $Ca^{2+}$ が必要なため<sup>17,19,20</sup>、過度の興奮が生じるような状況のもとで、その興奮性を抑える働きを有していると考えられている<sup>17,20</sup>。 $K_{DR}$ は、細胞内の $Ca^{2+}$ に感受性を持たず、 $K_{Ca}$ に比べてコンダクタンスが小さい<sup>23</sup>。低濃度のTEA、グリベングラマイドに影響されず、4-APには感受性を持つ<sup>23</sup>。生理的な温度、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度、膜電位のもとでは $K_{Ca}$ に比べて $K_{DR}$ の開率が圧倒的に高く、 $K_{DR}$ は主として静止膜電位の制御に参与しているものと考えられている<sup>21</sup>。 $K_{Ca}$ と $K_{DR}$ の役割は上記のように区別されるが、しかし、メサコリン (MCh) 等のムスカリニック作用薬が気道平滑筋の興奮性を高める機序として、生理的条件下ではほとんど開いていないはずの $K_{Ca}$ を閉じるためである、という報告もあり<sup>29</sup>、実は $K^+$ チャネルの正確な役割についてもあいまいな所が多いのが現状である。

$K^+$ 電流は外向き電流の主体をなすため、 $K^+$ チャネルが多く分布する



気道平滑筋では、刺激に対する膜の脱分極（内向き電流）は緩徐で、“graded smooth muscle” と呼ばれる<sup>7</sup>が、時にすばやい電氣的現象も認められる<sup>28, 30, 11</sup>。自発性の一過性外向き電流（spontaneous transient outward currents: STOCs）である。STOCsは今までに血管<sup>31</sup>、腸管<sup>31, 32</sup>、冠動脈<sup>33</sup>等様々な臓器の平滑筋で報告されており、SRからの自発性のCa<sup>2+</sup>放出に応じてCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>電流が流れることが原因と考えられている<sup>32, 34</sup>。この現象は気道平滑筋でも認められるが<sup>28, 30, 34, 11</sup>、その基礎的な機序は明確になっていない。JanssenとSimsは自発性の一過性内向き電流（spontaneous transient inward currents: STICs）を報告している<sup>30</sup>。STICsはCa<sup>2+</sup>依存性のCl<sup>-</sup>電流で、STOCsと同期して現れることから、STOCsとSTICsは同じ細胞内Ca<sup>2+</sup>の変動の異なった表現と考えられる。

### 3. 平滑筋の細胞内情報伝達 —細胞内Ca<sup>2+</sup>について—

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）は、機械的現象および電氣的現象に影響を及ぼし、平滑筋の緊張を制御する役割を担っている<sup>9, 11, 22</sup>。平滑筋では細胞内のCa<sup>2+</sup>は、電位依存性のCa<sup>2+</sup>チャネルあるいは受容体作動性のCa<sup>2+</sup>流入経路を経て細胞外から入る場合と、細胞内のCa<sup>2+</sup>プールから放出される場合がある<sup>10, 11, 25, 38</sup>。イノシトール1,4,5-三リン酸（D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate: IP<sub>3</sub>）は細胞内Ca<sup>2+</sup>を動員させる物質として同定されて以来、平滑筋を含め<sup>11</sup>多くの組織でCa<sup>2+</sup>を介した細胞機能に情報を伝えるセカンドメッセンジャーとして確立している<sup>12, 39</sup>。ACh、HA、サブスタンスP、エンドセリン（ET）、ロイコトリエンやプロスタグランジンなど様々な収縮物質で細胞内のIP<sub>3</sub>が上昇し、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇することが知られている<sup>10, 40, 41, 42</sup>。ブタの気管平滑筋では、IP<sub>3</sub>の量と収縮が平行するという報告がある<sup>41</sup>。しかし、IP<sub>3</sub>による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の増加と収縮とに直接的な関係はないとする報告もある。例えば、コリン作働薬による収縮とIP<sub>3</sub>生成の濃度—反応曲線を比較した実験では、IP<sub>3</sub>の濃度—反応曲線の方が収縮の濃度—反応曲線よりも1オーダー右にずれることが報告されている<sup>43</sup>。また、IP<sub>3</sub>の合成を抑制しても、HAやMChによる収縮に変化が見られないという報告がある一方<sup>44</sup>、全く逆の結論を示す報告も見られる<sup>42</sup>。もっと最近では、Cuthbertほかは、AChを含む一連の収縮物質に対する収縮反応は、Ca<sup>2+</sup>キレーターであるEGTAであらかじめ処理しておくことで消失すると述べている。この報告で彼らは、細胞内プールからのCa<sup>2+</sup>動員は、収縮にほとんど関与しないと結論している<sup>38</sup>。一方、気管支拡張薬として知られるイソプロテレノールは、筋の緊張を伴わずに、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を上昇させる<sup>44, 45, 46</sup>。以上のように、気道平滑筋細胞に於けるCa<sup>2+</sup>代謝と収縮との関係に関しては、解決すべき問題が多く残されている。



### 3. 研究目的

気道平滑筋は気管や気管支の構造の維持にあずかるとともに、その収縮は気管支喘息の病態を特徴づけるものとして重要である。しかし、研究背景の項で述べたように、概して気道平滑筋に対する生理学的知見は乏しく、混乱している状態である。

私は、ウシとモルモットの気管平滑筋で、パッチクランプ法を用いて主として電気生理学的立場から以下の項目について検討した。

1. 脱分極—収縮という関係が成り立つのか、ACh、MCh、HA、ET等の収縮物質を用いて収縮と膜電位の関係を検討した。さらにETについてHAとの相互作用についても電気的応答と等尺性張力の両方から観察した。

2. STOCsの実験から、膜の電気的現象に及ぼす細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の機序、加えて収縮と細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 動員の関係について検討した。

アンプのインプットの抵抗は2.5MΩで、弱い電圧をかけて細胞とのシールを作り、このときの抵抗は2.5GΩになるようにした。ジョイントポテンシヤル、膜容量等はアンプの回路で補正した。whole-cell configurationを作るときには膜電位を-40mVに固定し、電圧のパルスをかけて膜を破り、抵抗が500-600MΩに下がり、capacitative currentが上昇することで確認した。得られた電気信号は感熱式ペンレコーダ (Recu-Horiz-8K, NEC三栄社、東京)で記録した。使用した溶液は以下の通りである。細胞内液(ピペット液): 140mM KCl, 1.13mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glucose, 10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 1mM ethylene-glycol bis(β-aminocaprylate)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 1mM Na<sub>2</sub>ATP。細胞外液(浴槽液): 140mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.13mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glucose, 10mM HEPES。全ての溶液のpHは7.2とし、全ての実験は室温 (20-25℃)で行った。刺激物質を投与するときはポリオンチューブ (径0.5mm) を通して40-50cmH<sub>2</sub>Oの圧をかけて投与した。

#### 4.3. 等尺性張力測定

ウシでは3x10mmの筋組織切片を、モルモットでは5mm長の気管輪をKrebs-Henseleit (K-H) 溶液の入った10mlの容器に入れて測定した。K-H溶液は118mM NaCl, 3.9mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.3mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6mM glucoseの組成で、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>で飽和し、37℃に保った。等尺性張力測定では、全ての組織あるいは気管輪をトランスジェンサ (UL-10GR, Mincho社、東京) に付け、反応



## 4. 研究方法

### 4-1. 細胞の分離

ウシ気管は屠殺場より得、氷冷した細胞外液（組成は以下に記述）に入れて実験室まで運んだ。モルモットはエーテルで麻酔し、屠殺した後気管を摘出した。気管膜様部から粘膜、結合組織、脂肪を取り除いた後筋組織を細かくし、コラゲナーゼ（100U/ml）とエラスターゼ（5U/ml）の酵素溶液の中で40分間インキュベーションして単一平滑筋細胞を得た。パッチクランプ法の適用に際しては表面が平滑で、全体的に紡錘形をした細胞を用いた。

### 4-2. 電気記録

標準的なパッチクランプ法を適用した。増幅器はList LM-EPC7 (List electronics社、ダルムスタット、ドイツ)とEPC9(HEKA electronics社、ラムブレヒト/ファルツ、ドイツ)を用いた。電極(Drummond Scientific社、アメリカ)のチップの抵抗は2-5M $\Omega$ で、弱い陰圧をかけて細胞とのシールを作り、このときの抵抗は2-5G $\Omega$ になるようにした。ジャンクションポテンシャル、膜容量等はアンプの回路で補正した。whole-cell configurationを作るときには膜電位を-40mVに固定し、陰圧のパルスをかけて膜を破り、抵抗が500-600M $\Omega$ に下がり、capacitative currentが上昇することで確認した。得られた電気信号は感熱式ペンレコ-ダ-(Recti-Horiz-8K、NEC三栄社、東京)で記録した。使用した溶液は以下の通りである。細胞内液(ピペット側) : 140mM KCl, 1.13mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glucose, 10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 1mM ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 1mM Na<sub>2</sub>ATP。細胞外液(容器側) : 140mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.13mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glucose, 10mM HEPES。全ての溶液のpHは7.2とし、全ての実験は室温（20-25℃）で行った。刺激物質を投与するときはポリテンチューブ（径0.5mm）を通して40-50cmH<sub>2</sub>Oの圧をかけて投与した。

### 4-3. 等尺性張力測定

ウシでは3x10mmの筋組織片を、モルモットでは5mm幅の気管輪をKrebs-Henseleit (K-H)溶液の入った10mlの容器に入れて測定した。K-H溶液は118mM NaCl, 5.9mM KCl, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.6mM glucoseの組成で、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>で飽和し、37℃に保った。等尺性張力測定では、全ての組織あるいは気管輪を圧トランスジューサ-(UL-10GR、Minebea社、東京)に付け、反応



はポリグラフ (Rectigraph-8K、NEC三栄、東京) で記録した。最適な測定変化を得るために最初に1gの張力を与えた。

### 5-1. 基礎的検討

種々の実験に先立ち、ラシ気管平滑筋で得られた基礎的データを示す。静止膜電位の平均は $-47.0 \pm 3.9 \text{ mV}$  ( $n=24$ )であった。cell-attached、inside-out、outside-out patch による検索から最も多く観察されるチャネルはコンダクタンスが $127.1 \pm 3.8 \text{ pS}$  ( $n=33$ )で、電位依存性のあるチャネルであった (図3)。電流-電圧関係曲線より逆転電位はおよそ $-80 \text{ mV}$ で、この条件の細胞内外のイオン組成の関係から、 $\text{K}^+$ の平衡電位に近似する。また、 $10 \text{ mM TEA}$ によりチャネルは閉じ、inside-out patchで細胞内側 (すなわち、容器側) の $\text{Ca}^{2+}$ をEGTAでキレートするとチャネルが閉じることより (図4)、このチャネルが細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ に感受性を持つ $\text{K}_\text{c}$ チャネルと判断された。本実験でのコンダクタンスは $127.1 \pm 3.8 \text{ pS}$ で、一般の報告の $\text{K}_\text{c}$ チャネルよりも低い値になっているが<sup>10,11</sup>、ピペット側が高濃度の $\text{K}^+$ 、容器側は高濃度の $\text{Na}^+$ のため、両側ともに高濃度の $\text{K}^+$ にしている一般の報告の $\text{K}_\text{c}$ チャネルよりも低い値になっているものと考えられる。また、図4のinside-out patchでは細胞内側 (容器側) の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は $1.2 \text{ mM}$ で、細胞内としては高濃度になっているが、これはチャネルの $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を見ているので、高濃度の $\text{Ca}^{2+}$ が実験条件に直接大きな影響を与えてはいないと考えられる。whole-cell configurationにして電流-電圧関係曲線を作ると図5が得られた。これをTEAで処理すると電流は著しく抑制されたが、完全には抑制されなかった。whole-cellで細胞の膜コンダクタンスを測べると、 $2.24 \pm 0.19 \text{ nS}$ から $1.55 \pm 0.14 \text{ nS}$ へ有意に抑制されるが ( $p < 0.002$ ,  $n=27$ )、やはり完全な抑制ではなかった (図6)。次に、やはりwhole-cell configurationにして、膜電位を $-40 \text{ mV}$ に固定し、 $-100 \text{ mV}$ から $+60 \text{ mV}$ まで $20 \text{ mV}$ ずつ電圧パルスを与えると、短い内向き電流がでた後、大きな外向き電流が流れるのが観察された (図7-a)。内向き電流に注目すると、実は $-40 \text{ mV}$ 以下では電流は認められず、 $-20 \text{ mV}$ から観察される (図7-b)。

### 5-2. 種々の刺激に対する膜電位の変化

平滑筋を収縮させる種々の刺激に対する膜電位の変化を観察した。まず、 $\text{TEA } 10 \text{ mM}$ を投与すると膜電位は急激に脱分極を示し、それに伴って膜抵抗が著しく増加した (図8-a)。また、 $\text{MCh } 10 \mu\text{M}$ を投与しても膜は脱分極したが、膜抵抗は減少する傾向を示した (図8-b)。HAを投与すると、TEAの場合とは異なり、膜電位は徐々に過分極を示した (図9-a)。またHA投与中でETIを $100 \text{ mM}$ 投与すると膜電位はさらに過分極し、平滑筋細胞は収縮して時に電極からはずれた (図9-b)。さらに、TEA



## 5. 研究結果

### 5-1. 基礎的検討

種々の実験に先立ち、ウシ気管平滑筋で得られた基礎的データを示す。静止膜電位の平均は $-47.0 \pm 3.9 \text{ mV}$  ( $n=24$ )であった。cell-attached、inside-out、outside-out patch による検索から最も多く観察されるチャンネルはコンダクタンスが $127.1 \pm 3.8 \text{ pS}$  ( $n=33$ )で、電位依存性のあるチャンネルであった(図3)。電流-電圧関係曲線より逆転電位はおよそ $-80 \text{ mV}$ で、この条件の細胞内外のイオン組成の関係から、 $\text{K}^+$ の平衡電位に近似する。また、 $10 \text{ mM TEA}$ によりチャンネルは閉じ、inside-out patchで細胞内側(すなわち、容器側)の $\text{Ca}^{2+}$ をEGTAでキレートするとチャンネルが閉じることより(図4)、このチャンネルが細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ に感受性を持つ $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャンネルと判断された。本実験でのコンダクタンスは $127.1 \pm 3.8 \text{ pS}$ で、一般の報告の $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャンネルよりも低い値になっているが<sup>19,47</sup>、ピペット側が高濃度の $\text{K}^+$ 、容器側は高濃度の $\text{Na}^+$ のため、両側ともに高濃度の $\text{K}^+$ にしている一般の報告の $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャンネルよりも低い値になっているものと考えられる。また、図4のinside-out patchでは細胞内側(容器側)の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は $1.2 \text{ mM}$ で、細胞内としては高濃度になっているが、これはチャンネルの $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を見ているので、高濃度の $\text{Ca}^{2+}$ が実験条件に直接大きな影響を与えてはいないと考えられる。whole-cell configurationにして電流-電圧関係曲線を作ると図5が得られた。これをTEAで処理すると電流は著しく抑制されたが、完全には抑制されなかった。whole-cellで細胞の膜コンダクタンスを調べると、 $2.24 \pm 0.19 \text{ nS}$ から $1.55 \pm 0.14 \text{ nS}$ へ有意に抑制されるが( $p < 0.0002$ ,  $n=27$ )、やはり完全な抑制ではなかった(図6)。次に、やはりwhole-cell configurationにして、膜電位を $-40 \text{ mV}$ に固定し、 $-100 \text{ mV}$ から $+60 \text{ mV}$ まで $20 \text{ mV}$ ずつ電圧パルスを与えると、短い内向き電流がでた後、大きな外向き電流が流れるのが観察された(図7-a)。内向き電流に注目すると、実は $-40 \text{ mV}$ 以下では電流は認められず、 $-20 \text{ mV}$ から観察される(図7-b)。

### 5-2. 種々の刺激に対する膜電位の変化

平滑筋を収縮させる種々の刺激に対する膜電位の変化を観察した。まず、 $\text{TEA } 10 \text{ mM}$ を投与すると膜電位は急激に脱分極を示し、それに伴って膜抵抗が著しく増加した(図8-a)。また、 $\text{MCh } 10 \mu\text{M}$ を投与しても膜は脱分極したが、膜抵抗は減少する傾向を示した(図8-b)。HAを投与すると、TEAの場合とは異なり、膜電位は徐々に過分極を示した(図9-a)。またHA投与下でET1を $100 \text{ nM}$ 投与すると膜電位はさらに過分極し、平滑筋細胞は収縮して時に電極からはずれた(図9-b)。さらに、TEA



で膜電位が脱分極した状態でET1を投与すると、膜電位は過分極傾向を示し、細胞は収縮した（図9-c）。TEA、ACh、HA、ETはいずれも平滑筋細胞を収縮に向かわせる物質であるが、図10に示す様に、TEA、AChは有意に膜電位を脱分極させるのに対し、HAは有意に過分極させた。また、ETも過分極させる傾向を示した。

### 5-3. ETが電気現象に及ぼす影響

図9-b、9-c、図10で見られるように、ETは膜を過分極させる傾向があるため、この過分極が何によるものか検討した。図11の上段はチャンネルのtraceで、膜電位は+60mVに固定している。大きなチャンネルは低濃度のTEAで消失し、 $K_{Ca}$ であると考えられる。TEA 10mMで $K_{Ca}$ を閉じた状態でET1 100nMを投与すると小さなチャンネルが観察された。下段の電流-電圧関係曲線からは、このチャンネルは逆転電位が-80mV付近で、細胞内外のイオン組成の関係から $K^+$ の平衡電位に近似する。またコンダクタンスは20pSと小さく、低濃度のTEAに感受性を示さないことからBoyleほか<sup>23</sup>の報告する $K_{DR}$ と考えられた。

### 5-4. ETのHAに対する相乗効果（等尺性張力の測定による検討）

図8-bで観察されるように、ET1はHAによる膜電位の過分極をさらに強める傾向があるため、この効果を張力でも調べてみた。図12上段は、ウシの平滑筋組織片を細胞外液に入れ、HAで刺激したものである。一方、下段はあらかじめET1を100pMで処理し、その後にHAで刺激した。なお、100pMのET1では平滑筋の収縮は認められなかった。ET1で処理した方は、処理しなかった方に比べてより低濃度のHA刺激で反応を示しはじめた。

### 5-5. STOCsの特性

今回の実験で、ウシから得られるSTOCsもモルモットから得られるSTOCsも電気生理学的、薬理学的に同様の反応を示すため、データは一緒に示した。酵素処理して得られた単一細胞を-40mVで固定したwhole-cell configurationで観察したところ、およそ16%(42/262)の細胞でSTOCsが観察された（図13-a）。固定電位を-40mVにした理由は、今までの実験で平滑筋の静止膜電位が-40mVであること、また、この固定電位では電位依存性の $Ca^{2+}$ チャンネルが開かないと予想されることによる（ヒト気管支平滑筋で電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルの開く閾値はおよそ-26mV<sup>48</sup>）。Janssenほか<sup>24,30</sup>が指摘する様に、STOCsが現れている時に、平滑筋自身は収縮も弛緩もしない。この繰り返し現れる外向き電流は振動数、振幅共に膜過分極により減少、膜脱分極により上昇した（図13-b）。また、逆転電位は-80mV付近で、これは、細胞内外のイオン組成より $K^+$ の平衡電位に近似する（図13-b）。電流固定した状態では、STOCsは繰り返す



膜過分極として観察される。ここで、膜透過性の $\text{Ca}^{2+}$ キレーターである1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)-acetoxymethyl (AM) (50 $\mu\text{M}$ )を投与すると、繰り返す過分極は徐々に消失した(図13-c)。STOCsは5-10mMのTEAで完全に消失するが(図13-d)、4-APの影響は受けなかった。これらのデータは、他に報告されているものと一致するものであり<sup>24, 28, 30, 31, 33</sup>、STOCsが $\text{Ca}^{2+}$ 感受性で電位依存性の大きなコンダクタンスを持つ $\text{K}^{+}$ チャネル(すなわち、 $\text{K}_{\text{Ca}}$ )の活性化によるものであることを示している。STOCsは、whole-cell configurationでインドメタシン(10 $\mu\text{M}$ )の細胞外投与により減弱するが(図14-a)、outside-out configurationから、インドメタシンは $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャネル自身には影響しないことが観察された(図14-b)。

#### 5-6. 細胞内 $\text{IP}_3$ がSTOCsに及ぼす影響

ピペットの中に $\text{IP}_3$ を10-20 $\mu\text{M}$ 加えると、whole-cell configurationでSTOCsが顕著に認められるようになる。 $\text{IP}_3$ の存在下でおよそ70%(12/17)の細胞でSTOCsが観察された。これは $\text{IP}_3$ を入れない場合(16%)に比べて有意に増加している( $p < 0.0001$ , Fischer's exact probability test)。 $\text{IP}_3$ を入れた場合のSTOCsは、TEAで抑制され、電位依存性、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性があるという点で、 $\text{IP}_3$ を入れていない場合のSTOCsと全く同一である。 $\text{IP}_3$ 未処理の場合では、インドメタシンによってSTOCsは減弱したが(図14-a)、 $\text{IP}_3$ 処理した場合にはインドメタシンの影響は受けなかった。

#### 5-6. STOCsに対する種々の薬物の影響

図15-aに示すように、コリン作働性刺激薬のカルバコール(CCh) 100 $\mu\text{M}$ やACh 1 $\mu\text{M}$ を投与すると一過性に大きな外向き電流が流れ、その後STOCsは完全に抑制される。カフェイン(5-10mM)を投与しても同様の反応が観察される(図15-b)。カルシウムイオノフォアであるイオノマイシン(1 $\mu\text{M}$ )を投与すると、若干活性化された後可逆性に抑制される(図15-c、 $n=4$ )。また、HA(0.1-1mM)ではSTOCsは振動数、振幅共に増大する。一方、 $\beta$ -刺激薬であるイソプロテレノール(10 $\mu\text{M}$ )では、STOCsは活性化されることなく消失する(図16-a、 $n=4$ )。しかし、ピペットを通して $\text{IP}_3$ を細胞内に投与すると、反応はむしろ増大する。これと同様の反応は、臨床的に気管支拡張薬として使われるアミノフィリン(0.25mg/ml)でも観察された(図16-b、 $n=3$ )。細胞内のcAMPの増強剤として知られる3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (1mM)と8-chlorophenylthio adenosine 3',5'-monophosphate (CPT-cAMP) (0.1mM)を併せて投与すると、 $\text{IP}_3$ の存在下でSTOCsは増強した(図16-c)。

#### 5-7. モルモットの気管輪の収縮に対する細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の効果



既述したように、STOCsの出現中、細胞は収縮も弛緩もしない。今までの結果よりSTOCsは細胞内プールからの $\text{Ca}^{2+}$ 放出によることが理解されるので、収縮に関し、細胞外の $\text{Ca}^{2+}$ を除いた状態でACh (1mM)、HA (1mM)の刺激に対する等尺性張力を観察した。2.5mMの $\text{Ca}^{2+}$ を含んだK-H溶液では、ACh、HA共に各々最大 $3.40 \pm 0.9 \text{ g}$  (n=11)、 $2.04 \pm 0.3 \text{ g}$  (n=3)の反応をしめす。次に $\text{Ca}^{2+}$ を含まない名目上の $\text{Ca}^{2+}$ 除去K-H溶液でも、各々 $2.96 \pm 0.7 \text{ g}$  (n=4)、 $1.63 \pm 0.3 \text{ g}$  (n=3)の反応が得られた(図17-a(i)、b(i))。しかし、名目上の $\text{Ca}^{2+}$ 除去K-H溶液にEGTA (1mM)を加えた溶液では反応はほぼ完全に抑制された(図17-a(ii)、b(ii))。これはTEAを投与した場合でも同様である(図17-c、n=4)。引き続き $\text{Ca}^{2+}$  4mMを溶液内に投与すると、筋組織は収縮する。また、カフェインは収縮物質で収縮した気管輪を弛緩させた(図17-b、n=5)。



## 6. 考察

細胞内外に存在するイオンは、その濃度勾配および電氣的勾配に従って移動し、両者の勾配の釣り合うところで平衡に達する。この平衡を維持する平衡電位は、Nernstの方程式によって以下のように決まる<sup>49</sup>。

$$E_i = RT(\ln [i]_o/[i]_i) / FZ$$

ここで、 $E_i$ ：イオン*i*の平衡電位、 $R$ ：気体定数、 $T$ ：絶対温度、 $F$ ：Faraday（1モルの1価イオンの持つ電荷量）、 $Z$ ：*i*の原子価、 $[i]_o$ ：*i*の細胞外濃度、 $[i]_i$ ：*i*の細胞内濃度とする。

そこで、本実験の条件で室温を25℃として計算すると、 $K^+$ の平衡電位は-87.1mV、 $Cl^-$ が0mV、 $Na^+$ が+109.1mVとなる。

基礎的な検討から、平滑筋上で圧倒的に観察されたのは $K_{Ca}$ チャネルである。実験から得られた逆転電位はおよそ-80mVであったが、計算上の-87.1mVという値に近似される。ところで、膜電位を構成するイオンが $K^+$ だけならば、静止膜電位は-87.1mVになるはずであるが、実際は-47.0±3.9mVと、もっと陽性にあり、他のイオンの関与が示唆される。このことは、TEAで細胞を処理しても、細胞を流れる電流（図5）や膜のコンダクタンス（図6）が完全に抑制されないことから理解される。一般に、膜電位の値は、細胞内外の $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ の濃度分布と膜のこれらのイオンに対する透過性の如何によって決まるものとされ、Goldmanの定電場方程式が以下のように与えられている<sup>49</sup>。

$$V = RT \ln \left( \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_o}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_i} \right) / F$$

ここで、 $V$ ：膜電位、 $P_K$ 、 $P_{Na}$ 、 $P_{Cl}$ ：膜の $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cl^-$ の透過性とする。Janssenほかの報告によれば、モルモット平滑筋で、 $Cl^-$ 電流および非選択性の陽イオン電流の存在が確認されているので<sup>24</sup>、この2種類の電流も膜電位の構成に関与していることが十分に考えられる。このほかに重要なイオンは $Ca^{2+}$ である。 $Ca^{2+}$ の組成は、細胞外の濃度が細胞内の濃度の1万倍に達するため、濃度勾配、電氣的勾配いずれによっても細胞外から細胞内に向かう。図7で観察される内向き電流はKotlikoffが既に報告している $Ca^{2+}$ 電流と一致する<sup>50</sup>。図7-bから観察されるように、この電流は-40mVではほとんど流れず、これより陽性で内向きに流れる。すなわち、静止膜電位の-47mV付近ではこの $Ca^{2+}$ 電流は流れていないので、膜電位の構成には関与していないと考えた。興味深いことに、この内向き電流の流れ始める値は、ヒト気管支平滑筋の電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルの開く閾値-26mVに近く<sup>48</sup>、このことからこの電流が電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルを介した $Ca^{2+}$ 電流であることが確認できる。



本実験で、TEA、AChが膜を脱分極させたのに対し、HAおよびETは過分極させた。また、これらの物質はいずれも細胞を収縮させた。AChが膜を脱分極し、収縮することはCoburnほかが報告するように、脱分極により電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが開き、細胞外から $\text{Ca}^{2+}$ の流入があって収縮すると考えられる<sup>10</sup>。一方、HAで過分極する機序の説明として、以下のことが考えられる。Janssenほかによれば、モルモット気管平滑筋で、HAにより $\text{Cl}^-$ 電流と $\text{K}^+$ 電流が活性化されるという<sup>51</sup>。 $\text{Cl}^-$ 電流は生理的膜電位では内向き、すなわち脱分極方向に働くが、 $\text{K}^+$ 電流は外向き、つまり過分極方向に働く。本実験の結果から考察すると、 $\text{K}^+$ 電流の成分の影響で、膜は過分極したと考えることもできる。ETは $\text{K}_{\text{DR}}$ を開いて膜を過分極することが確認された（図11）。これは、気道平滑筋では初めての知見であるが、心筋細胞では、ET1が百日咳毒素感受性のG蛋白を介する $\text{K}$ 電流を活性化し、膜を過分極するとの報告が認められる<sup>52</sup>。図9に見られるように、ETはHAによる膜過分極をさらに強めている。また、等尺性の張力を測定しても、ETは、それだけでは直接収縮させない低濃度でHAによる収縮を増強させ（図12）、両者の相乗効果が示唆された。ヒト気道平滑筋では、HAの存在下で、膜を過分極させると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する<sup>25</sup>。つまりHAでは、膜脱分極による電位依存性の $\text{Ca}^{2+}$ を介して $\text{Ca}^{2+}$ 流入があるのではなく、HAが受容体に直接作用して流入する、いわゆる受容体依存性の $\text{Ca}^{2+}$ 流入が存在すると考えられている。アゴニストが直接作用した場合は、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は細胞内外の濃度勾配および電氣的勾配に従うため、膜過分極によって $\text{Ca}^{2+}$ 流入は増大する。本実験の結果を併せると、HAによる受容体依存性の $\text{Ca}^{2+}$ 流入は、ETが膜を過分極することで増強されるものと考えられる。モルモットで行われた*in vivo*の報告でも、低濃度のET1の存在下では、HAによる気道抵抗は増大するという<sup>53</sup>。

本研究で、STOCsは1) 電位依存性がある、2)  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性がある、3) TEA感受性がある、4) STOCsと同期して膜は過分極を繰り返す、という特性を示した（図13）。これらの所見は、大きなコンダクタンスを持ち、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のある $\text{K}^+$ チャネル（つまり $\text{K}_{\text{Ca}}$ ）を介した $\text{K}^+$ 電流であり、細胞内からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出により活性化されることを示しており、今までの報告に一致するものである<sup>24, 28, 31, 33</sup>。モルモットの気管平滑筋ではSTICsの報告もあり<sup>30</sup>、STOCsと同様に、 $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内で自発性に放出されていることを反映していると言う。すなわち、STICsは $\text{Ca}^{2+}$ 依存性 $\text{Cl}^-$ チャネルを介した $\text{Cl}^-$ 電流である。また、膜電位を-25mV程度で観察すると、STOCsと同時に観察できる<sup>30</sup>。この報告では、STOCsの混入を避けるために極めて陰性の膜電位（-70mV）で実験が行われている<sup>30</sup>。しかし、



このことは、深い膜電位故に、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ の変化が電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介した細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入によるものではないことを示している。興味深いことに、モルモットの気道平滑筋でのこの $\text{Cl}^-$ チャネルは、分泌腺の、非常に小さなコンダクタンスで、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性及び電位依存性を示す $\text{Cl}^-$ チャネルと非常によく似た特性を持っている<sup>35, 54</sup>。腺房細胞では、 $\text{Cl}^-$ 電流のオシレーションは生理学的に水分の分泌と関係し、これは、 $\text{IP}_3$ を介していることが確かめられている<sup>35, 36, 37</sup>。本実験では $\text{IP}_3$ を細胞内に投与するとSTOCsが顕著に見られるので、STOCsは平滑筋内で生成された $\text{IP}_3$ によって生じると考えられる。実際に、刺激を受けていないモルモット気管で、少量の $\text{IP}_3$ 生成が認められている<sup>31</sup>。刺激を受けない状態の気管平滑筋で $\text{IP}_3$ を生成する物質を確認するために、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンを適用すると、STOCsは消失する。ただし、outside-out patchでの実験で直接 $\text{K}_{\text{Ca}}$ に影響を及ぼすことはない（図14）。しかもピペットを通して $\text{IP}_3$ を細胞内に与えておくと、インドメタシンのSTOCs抑制効果は見られなくなる。従って、インドメタシンは $\text{IP}_3$ 生成の初期の段階で作用していることが示唆される。以上より、平滑筋細胞で普段 $\text{IP}_3$ を生成している物質はアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝産物（プロスタグランジン(PG)  $\text{E}_2$ や $\text{F}_{2\alpha}$ 等）が考えられる。

他の報告にも見られるように、コリン作働薬のACh、CChはSTOCsを一過性に増強した後消失させてしまう<sup>24, 28, 31, 33</sup>。このコリン作働薬による消失の効果は、一見、 $\text{IP}_3$ 感受性の $\text{Ca}^{2+}$ プールの枯渇<sup>31</sup>、あるいは百日咳毒素感受性のG蛋白を介した $\text{K}_{\text{Ca}}$ への直接的な抑制効果<sup>29</sup>にも見えるが、カフェインやイオノマイシンも同様の効果を示すため（図15）、特定の受容体に関係したものではないように思われる。一つの説明として、刺激によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇すると、細胞質中の $\text{IP}_3$ のSR上の受容体への結合が抑制され、結果的に $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の電流が抑制されることが考えられる。この $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性の $\text{IP}_3$ 受容体の脱感作は、種々の平滑筋で報告されている<sup>55, 56, 57</sup>。細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ は、 $\text{IP}_3$ 受容体に二相性に作用すると報告されている。例えば血管平滑筋では、 $\text{IP}_3$ 誘発性の $\text{Ca}^{2+}$ 放出は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がある一定の値

（300nM）に達するまではpositive feedbackに作用する<sup>55, 57</sup>。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がこの閾値を超えると、今度は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ が $\text{IP}_3$ 誘発性の $\text{Ca}^{2+}$ 放出に対してnegative feedbackに作用する。この二相性のfeedback機構は今回のSTOCsにも作用しているものと考えられる。と言うのも、コリン作働薬、カフェインやイオノマイシンで、STOCsは一過性に増強した後減弱するからである。一方、イソプロテレノールやインドメタシンは増強することなくSTOCsを抑制する。おそらく、これらは違った抑制機構を持つものと思われる。なぜ $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォア（イオノマイシン）が直接 $\text{K}_{\text{Ca}}$ を活性化し



ないのか明らかではない。ただし、ここで考えられることは、イオンチャネルや収縮装置が、それを刺激する $\text{Ca}^{2+}$ の由来（細胞外由来かあるいは細胞内由来か）を区別できる機構を有しているのではないかと考えられることである。あるいは、各々の効果器と $\text{Ca}^{2+}$ プールとの間で密接な関連があるのかもしれない<sup>36</sup>。実際に電子顕微鏡による観察では、ウシ気管平滑筋でSRはしばしば細胞膜直下にあると言われ<sup>7</sup>、形態学的にもイオンチャネルとSRの関連が示唆される。コリン作働薬がSTOCsを一過性に増強した後抑制したのに対し、HAは抑制効果を示さず、増強させた（図15-d）。このことに不思議はない。と言うのも、モルモットの気管平滑筋では1mM HAで生じる $\text{IP}_3$ の量は、0.1mM CChで生じる量の20%にすぎないからである<sup>42</sup>。従って、HAで生じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $\text{IP}_3$ 受容体を脱感作するほど十分には上昇していないと考えられる。このことは、Janssenほか、モルモットの気管でHAが $\text{K}^+$ 電流を少し活性化するとする報告<sup>51</sup>にも矛盾しない。

興味深いことに、イソプロテレノールはSTOCsを抑制する（図16-a）。しかしこれは、 $\beta$ -アドレノセプター刺激薬が $\text{K}_{\text{Ca}}$ を活性化するとする通説とは反対の所見である。久米ほかは、cell-freeのシステムで $\beta$ -アドレノセプターに直結するG蛋白を介した $\text{K}_{\text{Ca}}$ の直接の活性化と<sup>58,59</sup>、cAMP依存性のリン酸化機構を介した間接的な活性化があることを報告している<sup>60</sup>。後者の場合は、脂質二重膜で再構築した $\text{K}_{\text{Ca}}$ でも確認されており、cAMP依存性のリン酸化によって、チャネルは $\text{Ca}^{2+}$ に感受性を持つに至ると考えられている<sup>61</sup>。本実験で、 $\text{IP}_3$ の存在下でイソプロテレノールがSTOCsを増強することは、上記の報告と一致する。この増強効果が細胞内のcAMPを介していることは、ホスホジエステラーゼ阻害薬であるアミノフィリンを使った実験や（図16-b）、IBMXとCPT cAMPの併用投与による実験より理解される（図16-c）。従って、 $\text{IP}_3$ を細胞内に投与しないときに見られるイソプロテレノールの抑制効果はwhole-cellを用いた本実験で初めて明らかにされたもので（図16-a）、 $\beta$ -アドレノセプター刺激薬の別の作用によるものと考えられる。様々な薬物の中で、イソプロテレノールとその他のcAMPを上昇させる薬物が気道平滑筋のリン脂質の水解を抑制するという報告があるが<sup>62,63</sup>、これは本実験の結果と一致する。自発性の $\text{IP}_3$ 生成は、イソプロテレノールの存在下では消失し、従って、STOCsも消失する。一方、細胞内に $\text{IP}_3$ を入れればSTOCsは増強する。このことはcAMP依存性のリン酸化を含む機構を介していることを示唆している。

本実験では薬物がSTOCsに及ぼした作用は、等尺性張力に及ぼした作用と平行しない。すなわち、ACh、CCh、HAは細胞を収縮させるのに



対し、イソプロテレノールやカフェインは弛緩させる。STOCsそのものは、直接には細胞の収縮にも弛緩にも関与しないと言える。STOCsが抑制されると膜電位が変化し、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介した $\text{Ca}^{2+}$ の流入があって、二次的に収縮がおこることはあり得る。しかし、電位を固定した状態でAChやHAを投与しても、平滑筋は収縮する<sup>24,1</sup>。収縮の主要な部分は、恐らくは受容体依存性のチャンネルを介した細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入によるものと考えられる<sup>30,38,11</sup>。IP<sub>3</sub>を介した細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、気管の平滑筋の収縮にはほとんど関与していないと思われる。

最近、血管<sup>64</sup>や気道<sup>65</sup>の平滑筋で、複数のフェノタイプが報告されてきている。収縮や細胞骨格の蛋白を表現する様々なフェノタイプがあり、このことから平滑筋細胞には明らかに異なった特性を持ついくつかの細胞型があることが示唆される。収縮以外で持ちうる重要な特性は、分泌機能である。と言うのも、平滑筋細胞はコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンやサイトカインまでもを分泌するとの報告があるからである<sup>61</sup>。STOCsはこの非収縮の部分を反映しているかもしれないが、IP<sub>3</sub>が収縮以外の機能、例えば分泌等の機能にに關与しているとすれば、これまでのIP<sub>3</sub>測定を含めた生化学的知見、 $\text{Ca}^{2+}$ 測定などの報告は、この視点からいまいちど検討が必要と思われる。



## 7. 結論

1. 気道平滑筋の収縮物質であるTEA、ACh、HA、ETは、TEA、AChが膜を脱分極させるのに対し、HA、ETは膜を過分極させ、ETはHAによる膜過分極をさらに増強させる傾向を示した。脱分極-収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきであると考えられた。
2. ETは、それだけでは直接収縮させない低濃度でHAによる収縮を増強させた。
3. STOCsは、 $IP_3$ を介した細胞内プールからの $Ca^{2+}$ 放出により生じる。
4. 収縮をおこすACh、CCh、HA、弛緩をおこすカフェインはいずれもSTOCsを一時的にでも活性化した。従って、STOCsを生じる $IP_3$ を介した $Ca^{2+}$ 放出は収縮、弛緩とは直接関係ないものと考えられた。
5. ウシ、モルモットの気道平滑筋では、収縮には主として細胞外からの流入による $Ca^{2+}$ が関与していると考えられた。



## 8. 引用文献

### 原著

I. Nara, M., Sasaki, T., Shimura, S. et al. Effects of endothelin and histamine on membrane potentials of bovine tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* (submitted).

II. Nara, M., Sasaki, T., Irokawa, T., et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated spontaneous transient outward currents in single tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* (submitted).

### 引用文献

1. 藤田尚男、藤田恒夫 (1988) 筋組織、標準組織学総論、第3版、医学書院、東京、pp 206-243.

2. 今泉祐治 (1993) 各種平滑筋細胞の興奮性の多様性とその機序について. 日薬理誌, 101, 219-231.

3. Honda, K., Satake, T., Takagi, K. et al. (1986) Effects of relaxants on electrical and mechanical activities in the guinea-pig tracheal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 87, 665-671.

4. Bond, M., Kitazawa, T. and Somlyo, A.P. et al. (1984) Release and recycling by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig portal vein smooth muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 355, 677-695.

5. 遠藤實 (1985) 筋肉とその収縮. 標準生理学 (本郷利憲、広重力、豊田順一ほか編)、医学書院、東京、pp 90-114.

6. de Lanerolle, P. (1989) Cellular control mechanisms in airway smooth muscle. In: *Airway Smooth Muscle in Health and Disease*, (Coburn, R.F. ed.), 1st ed., Plenum Press, New York, pp 99-125.

7. Cameron, A.R., Bullock, C.G., and Kirkpatrick, C.T. (1982) The ultrastructure of bovine tracheal smooth muscle. *J. Ultrastruct. Res.*, 81, 290-305.

8. Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1968) Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 159, 129-145.

9. Coburn, R.F. and Baba, K. (1989) Coupling mechanisms in airway smooth muscle. In: *Airway Smooth Muscle in Health and Disease*, (Coburn, R.F. ed.), 1st ed., Plenum Press, New York, pp 183-197.

10. Coburn, R.F. and Baron, C.B. (1990) Coupling mechanisms in airway



smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 258 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 2), L119-L133.

11. Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature (Lond.)*, 372, 231-236.

12. Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature (Lond.)*, 361, 315-325.

13. Hashimoto, T., Hirata, M., Itoh, T. et al. (1986) Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacological coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *J. Physiol. (Lond.)*, 370, 605-618.

14. Coburn, R.F. (1979) Electriomechanical coupling in canine trachealis muscle: acetylcholine contractions. *Am. J. Physiol.* 236 (*Cell Physiol.* 5), C177-C184.

15. Janssen, L.J., and Daniel, E.E. (1991) Depolarizing agents induce oscillations in canine bronchial smooth muscle membrane potential: possible mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 110-117.

16. 高橋國太郎 (1985) 興奮性膜. 標準生理学 (本郷利憲、広重力、豊田順一ほか編)、医学書院、東京、pp 42-74.

17. 富田忠雄 (1994) 気道平滑筋の電気的性質. 呼吸、13、824-829.

18. Nelson, M.T. and Quayle, J.M. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268 (*Cell Physiol.* 37), C799-C822.

19. McCann, J.D. and Welsh, M.J. (1986) Calcium-activated potassium channels in canine airway smooth muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 372, 113-127.

20. Kotlikoff, M.I. (1993) Potassium channels in airway smooth muscle: a tale of two channels. *Pharmacol. Therap.*, 58, 1-12.

21. Fleischmann, B.K., Washabau, R.J. and Kotlikoff, M.I. (1993) Control of resting membrane potential by delayed rectifier potassium currents in ferret airway smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 469, 625-638.

22. Kotlikoff, M.I., (1989) Ion channels in airway smooth muscle. In: *Airway Smooth Muscle in Health and Disease*, (Coburn, R.F. ed.), 1st ed., Plenum Press, New York, pp 169-182.

23. Boyle, J.P., Tomasic, M. and Kotlikoff, M.I. (1992) Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 447, 329-350.

24. Janssen, L.J. and Sims, S.M. (1992) Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol. (Lond.)*, 453, 197-218.



25. Murray, R.K., Fleischmann, B.K. and Kotlikoff, M.I. (1993) Receptor-activated Ca influx in human airway smooth muscle: use of Ca imaging and perforated patch-clamp techniques. *Am. J. Physiol.*, 264 (*Cell Physiol.* 33), C485-C490.
26. Cook, S.J., Small, R.C., Berry, J.L. et al. (1993)  $\beta$ -adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal  $K^+$ -channels in trachealis muscle: electrophysiological and mechanical studies in guinea-pig tissue. *Br. J. Pharmacol.*, 109, 1140-1148.
27. Chiu, P., Cook, S.J., Small, R.C. et al. (1993)  $\beta$ -adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal  $K^+$ -channels in bovine trachealis muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes. *Br. J. Pharmacol.*, 109, 1149-1156.
28. Saunders, H-M. H. and Farley, J.M. (1992) Pharmacological properties of potassium currents in swine tracheal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, 1038-1044.
29. Kume, H. and Kotlikoff, M.I. (1991) Muscarinic inhibition of single  $K_{Ca}$  channels in smooth muscle cells by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Am. J. Physiol.*, 261 (*Cell Physiol.* 30), C1204-C1209.
30. Janssen, L.J. and Sims, S.M. (1994) Spontaneous transient inward currents and rhythmicity in canine and guinea pig smooth muscle cells of the rabbit. *Pflügers Arch.*, 427, 473-480.
31. Benham, C.D. and Bolton, T.B. (1986) Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol. (Lond.)*, 381, 385-406.
32. Bolton, T.B. and Lim, S-P. (1989) Properties of calcium stores and transient outward currents in single smooth muscle cells of rabbit intestine. *J. Physiol. (Lond.)*, 409, 385-401.
33. Ganitkevich, V. and Isenberg, G. (1990) Isolated guinea pig coronary smooth muscle cells, -Acetylcholine induces hyperpolarization due to sarcoplasmic reticulum calcium release activating potassium channels. *Circ. Res.*, 67, 525-528.
34. Saunders, H-M.H. and Farley, J.M. (1991) Spontaneous transient outward currents and  $Ca^{++}$  activated  $K^+$  channels in swine tracheal smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257, 1114-1120.
35. Petersen, O.H. (1992) Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 448, 1-51.



36. Sasaki, T., Shimura, S., Wakui, M. et al. (1994) Apically localized IP<sub>3</sub> receptors control chloride current in airway gland acinar cells. *Am. J. Physiol.*, 267 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 11), L152-L158.
37. Wakui, M. Potter, B.V.L. and Petersen, O.H. (1989) Pulsatile intracellular calcium release does not depend on fluctuations in inositol trisphosphate concentration. *Nature (Lond.)*, 339, 317-320.
38. Cuthbert, N.J., Gardiner, P.J., Nash, K. et al. (1994) Roles of Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in agonist-induced contraction in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.*, 266 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 10), L620-L627.
39. Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signaling. *Nature (Lond.)*, 341, 197-205.
40. Barnes, P.J. (1989) Cell-surface receptors in airway smooth muscle. In: *Airway Smooth Muscle in Health and Disease*, (Coburn, R.F. ed), 1st ed., Plenum Press, New York, pp77-97.
41. Baron, C.B., Pompeo, J.N. and Coburn, R.F. (1992) Inositol 1,4,5-trisphosphate, inositide flux rates and pool sizes during smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol.*, 262, (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 6), L100-L104.
42. Salari, H., Bramley, A., Langlands, J. et al. (1993) Effect of phospholipase C inhibitor U-73122 on antigen-induced airway smooth muscle contraction in guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9, 405-410.
43. Grandordy, B.M., Cuss, F.M., Sampson, A.S. et al. (1986) Phosphatidylinositol response to cholinergic agonist in airway smooth muscle: relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238, 273-279.
44. Felbel, N.J., Trockur, B., Ecker, T. et al. (1988) Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J. Biol. Chem.*, 263, 16764-16771.
45. Takuwa, Y., Takuwa, N. and Rasmussen, H. (1988) The effect of isoproterenol on intracellular calcium concentration. *J. Biol. Chem.*, 263, 762-768.
46. Yamaguchi, H., Kajita, J. and Madison, J.M. (1995) Isoproterenol increases peripheral [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and decreases inner [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in single airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 268 (*Cell Physiol.* 37), C771-C779.
47. Garcia, C.M., Knaus, H.G., McManus, O.B. et al. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 269, 676-682.
48. Marthan, R., Martin, C., Amédée, T. et al. (1989) Calcium channel



currents in isolated smooth muscle cells from human bronchus. *J. Appl. Physiol.*, 66, 1706-1714.

49. 香川靖雄 (1985) 細胞とその環境. 標準生理学 (本郷利憲、広重力、豊田順一ほか編)、医学書院、東京、pp 29-39.

50. Kotlikoff, M.I. (1988) Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 254 (*Cell Physiol.* 23), C793-C801.

51. Janssen, L.J. and Sims, S.M. Histamine activates  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  currents in guinea-pig tracheal myocytes: convergence with muscarinic signalling pathway. *J. Physiol. (Lond.)*, 465, 661-677.

52. Ono, K., Tsujimoto, G., Sakamoto, A. et al. (1994) Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. *Nature (Lond.)*, 370, 301-304.

53. Kanazawa, H. Kurihara, N., Hirata, K. et al. (1992) Low concentration endothelin-1 enhanced histamine-mediated bronchial contractions of guinea pigs in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 717-721.

54. Marty, A., Tan, Y.P. and Trautman, A. (1984) Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *J. Physiol. (Lond.)*, 357, 297-325.

55. Iino, M. and Endo, M. (1992) Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Nature (Lond.)*, 360, 76-78.

56. Theibert, A.B., Supattapone, S., Worley, P.F. et al. (1987) Demonstration of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, 1283-1289.

57. Iino, M. and Tsukioka, M. (1994) Feedback control of inositol trisphosphate signalling by calcium. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 98, 141-146.

58. Kume, H., Hall, I.P., Washabau, R.J. et al. (1994)  $\beta$ -adrenergic agonists regulate  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 93, 371-379.

59. Kume, H., Graziano, M.P. and Kotlikoff, M.I. (1992) Stimulatory and inhibitory regulation of calcium-activated potassium channels by guanine nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11051-11055.

60. Kume, H., Takai, A., Tokumo, H. et al. (1989) Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature (Lond.)*, 341, 152-154.

61. Savaria, D., Lanoue, C., Cadieux, A. et al. (1992) Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 262 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 6), L327-L336.



62. Hall, I.P., Donaldson, J. and Hill, S.J. (1989) Inhibition of histamine-stimulated inositol phospholipid hydrolysis by agents which increase cyclic AMP levels in bovine tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 97, 603-613.

63. Madison, J.M. and Brown, J.K. (1988) Differential inhibitory effects of forskolin, isoproterenol, and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on phosphoinositide hydrolysis in canine tracheal smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, 82, 1462-1465.

64. Libby, P. (1995) Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91, 2844-2850.

65. Halayko, A.J., Ma, X. and Stephens, N.L.. (1995) Phenotypic markers of airway smooth muscle contractility. *American Thoracic Society Meeting '95*, A238. (Abstract).



## 図説明

図1. 膜の興奮性による平滑筋の分類。

図2. 平滑筋の収縮機序。  $\text{Ca}^{2+}$ が $10^{-5}\text{M}$ になるとカルモジュリンに結合し、今度はこの蛋白が不活型のみオシン軽鎖キナーゼに結合する。これにより、活性型となったキナーゼはみオシンをリン酸し、アクチンがみオシンの上を滑走し、収縮がおこる。 $\text{Ca}^{2+}$ が $10^{-7}\text{M}$ まで下がると軽鎖キナーゼはカルモジュリンから離れ、不活化する。この状況でみオシンホスファターゼがみオシンを脱リン酸化し、弛緩がおこる。

図3. ウシ気管平滑筋に分布する $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャンネル。 図の左側で膜の脱分極に伴いチャンネルの開率が上昇し、電位依存性が認められる。右側はoutside-out patchにしてとった電流-電圧関係曲線である。逆転電位はおよそ $-80\text{mV}$ で、この条件での $\text{K}^{+}$ の平衡電位に近似する。チャンネルのコンダクタンスは $127.1 \pm 3.8\text{pS}$ であった。

図4.  $\text{K}_{\text{Ca}}$ チャンネルに及ぼす細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 、TEAの効果。 a) inside-out patchで細胞内側をEGTAで $\text{Ca}^{2+}$ をキレートするとチャンネルの活性化が失われる。このことからこのチャンネルには $\text{Ca}^{2+}$ 感受性があることが理解される。 b) 細胞外からTEA 10mMを投与するとチャンネルは完全に閉じる。

図5. Whole-cell configurationで観察した電流-電圧関係曲線 (TEAの効果)。 TEA 10mM (○) の存在下では、電流は著しく抑制されるが、完全には抑制されない。

図6. 膜のコンダクタンス に及ぼすTEAの効果。 whole-cell configurationで膜のコンダクタンスを観察すると、TEA 10mMの存在下で有意に減少するが ( $p < 0.0002$ ,  $n = 27$ )、消失はしない。

図7. Whole-cell configurationでの電圧固定法による電流測定。 a) 膜電位を $-40\text{mV}$ に固定し、 $-100\text{mV}$ から $+60\text{mV}$ まで $20\text{mV}$ ずつ電圧パルスを与えると、短い内向き電流がでた後、大きな外向き電流が観察される。 b) 内向き電流に注目すると、実は $-40\text{mV}$ 以下では電流は認められず、 $-20\text{mV}$ から観察される。

図8. TEA (a)およびMCh (b)が膜電位に及ぼす影響。 Whole-cell



configurationで、電流固定法による測定で膜電位を観察した。TEA 10mMとMCh 10 $\mu$ Mはいずれも膜電位を脱分極させた。下向きのスパイクは膜抵抗を表わすが、TEAが膜抵抗を著しく上昇させるのに対し、MChはむしろ減少させた。

図9. HA (a)およびET1 (b)が膜電位に及ぼす影響。 HA 10 $\mu$ Mは膜を過分極させ、ET1 100nMは過分極をさらに増強させた。(c)に示すように、TEAで膜電位を脱分極させた状態でET1を投与すると、膜電位は過分極傾向を示し、細胞は収縮して電極からはずれた。

図10. 種々のアゴニストによる膜電位の変化。 細胞を収縮させるTEA、ACh、HA、ETは、TEA、AChが有意に膜を脱分極させるのに対し（各々 $p<0.001$ ,  $n=12$ ;  $p<0.02$ ,  $n=4$ ）、HAは有意に過分極させ（ $p<0.01$ ,  $n=8$ ）、ETも過分極させる傾向を示した（ $p=0.08$ ,  $n=4$ ）。

図11. ET1によって開く $K^+$ チャネル。 a) チャネルのtraceで、膜電位は+60mVに固定している。大きなチャネルは10mM TEAで消失し、 $K_{Ca}$ チャネルと考えられる。TEAで $K_{Ca}$ を閉じた状態でET1 100nMを投与すると小さなチャネルが観察された。 b) 小さなチャネルから得られた電流-電圧曲線より、このチャネルの逆転電位はおおよそ-80mV付近で、この実験条件での細胞内外のイオン組成の関係から $K^+$ の平衡電位に近似する。

図12. ET1のHAに対する相乗効果（等尺性張力の測定による検討）。上段は組織片を細胞外液に入れ、HAで刺激したものである。一方、下段はあらかじめET1 100pMで処理し、その後にHAで刺激した。なお、100pMのET1では平滑筋の収縮は認められなかった。ET1で処理した方は、処理しなかった方に比べてより低濃度のHA刺激で反応を示し始めた。

図13. STOCsの一般的特性。 a) STOCsの典型的なtrace。Whole-cell configurationで、電位は-40mVに保持。 b) 同じ細胞で、膜を脱分極させると、STOCsは振動数、振幅共に増強し、電位依存性を示す。 c) 電流固定法により膜電位の変化を観察すると、STOCsに同期して、繰り返す過分極が認められる。ここで、膜透過性の $Ca^{2+}$ キレーターであるBAPTA-AM (50 $\mu$ M)を投与すると、繰り返す過分極は消失する。 d) STOCsは5-10mMのTEAで完全に消失する。

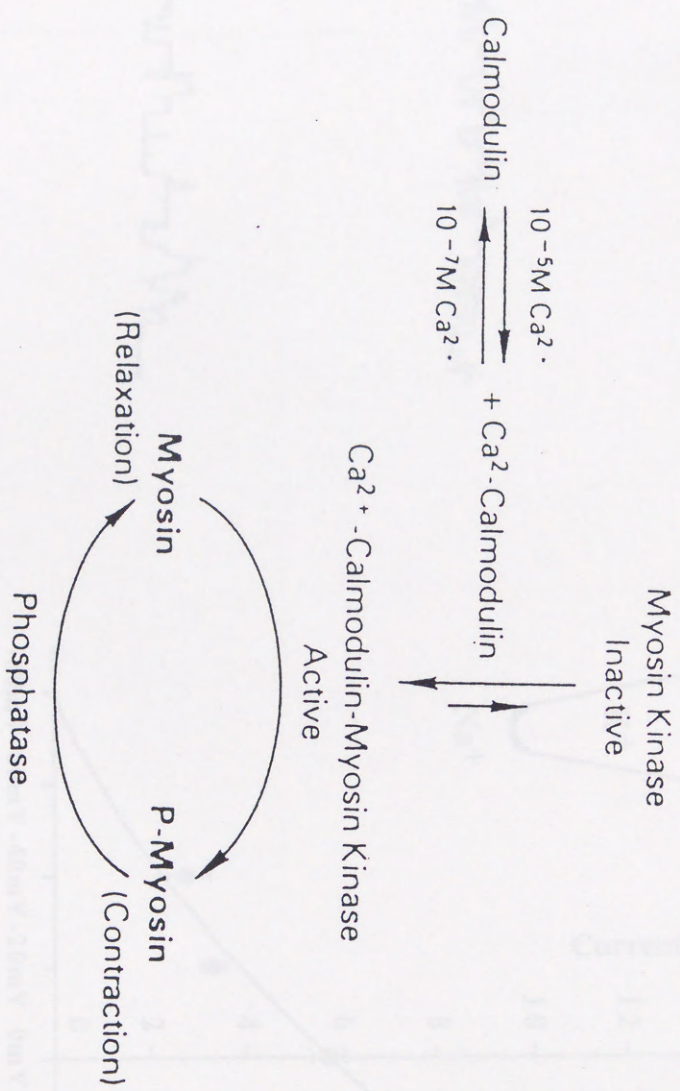


## 膜の興奮性による平滑筋の分類 (文献2による)

- A. 自発性の活動電位を発生する平滑筋  
膀胱、消化管の多くの部分、門脈など。
- B. 自発性の活動電位を発生しないが、自律神経刺激や筋直接の電氣的刺激などによって活動電位を発生する平滑筋  
精管、尿管、尿管、胃底部、腸管膜動脈など。
- C. 生理的条件下では刺激によっても活動電位を発生しない興奮性の低い平滑筋  
気管、大動脈、肺動脈など。




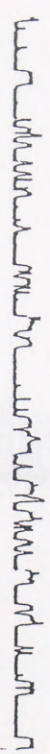
## 平滑筋の収縮機序 (文献6による)

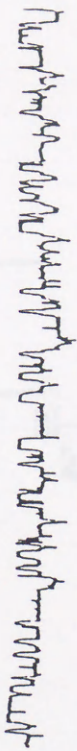


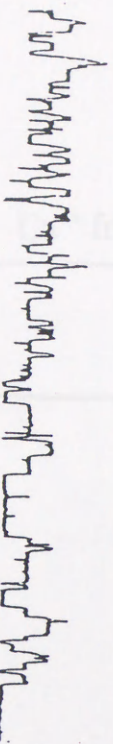


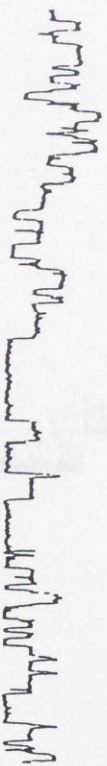
a.

-20mV 

0mV 

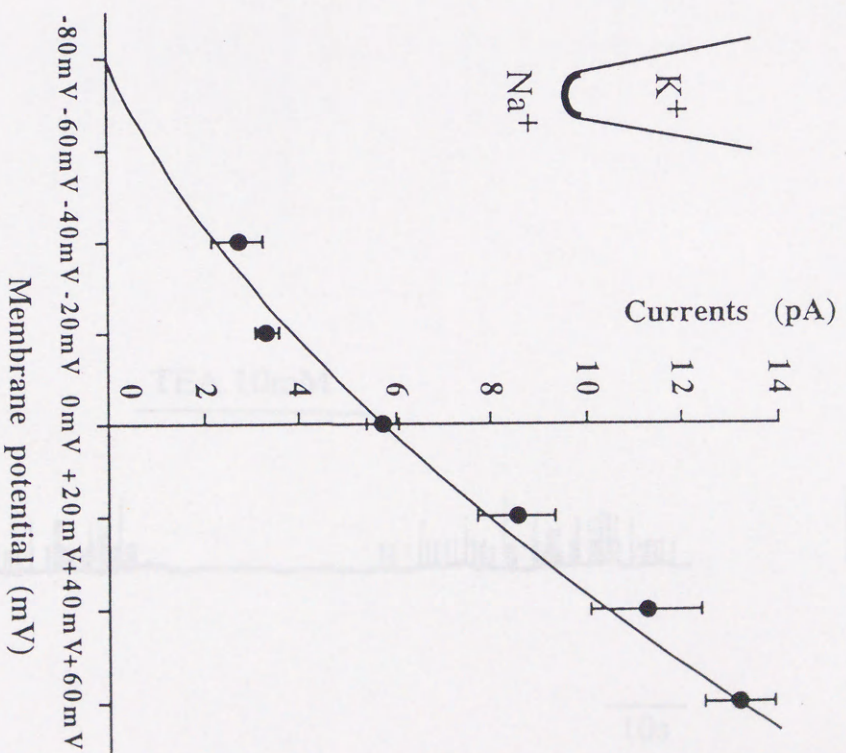
+20mV 

+40mV 

+60mV 

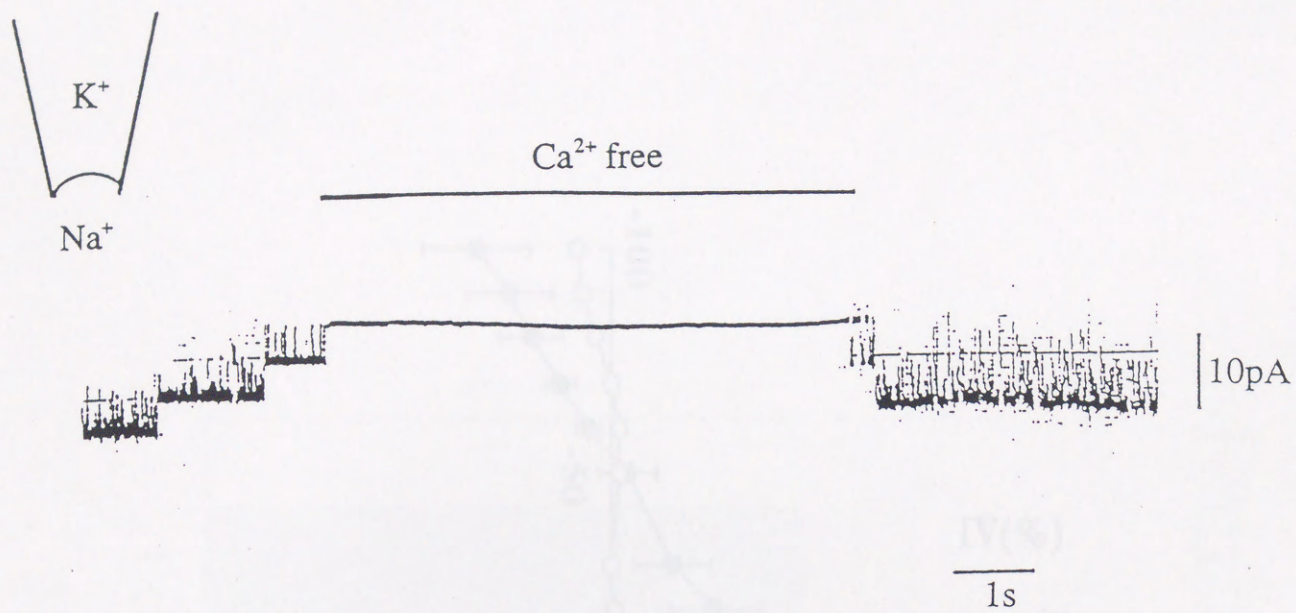
1s

b.

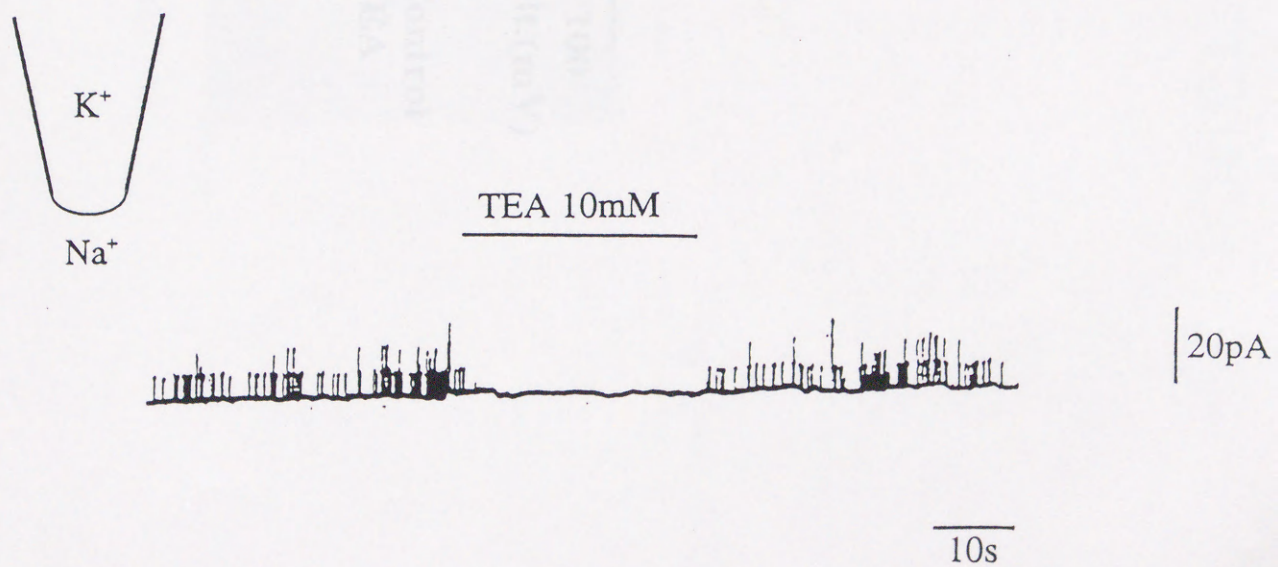




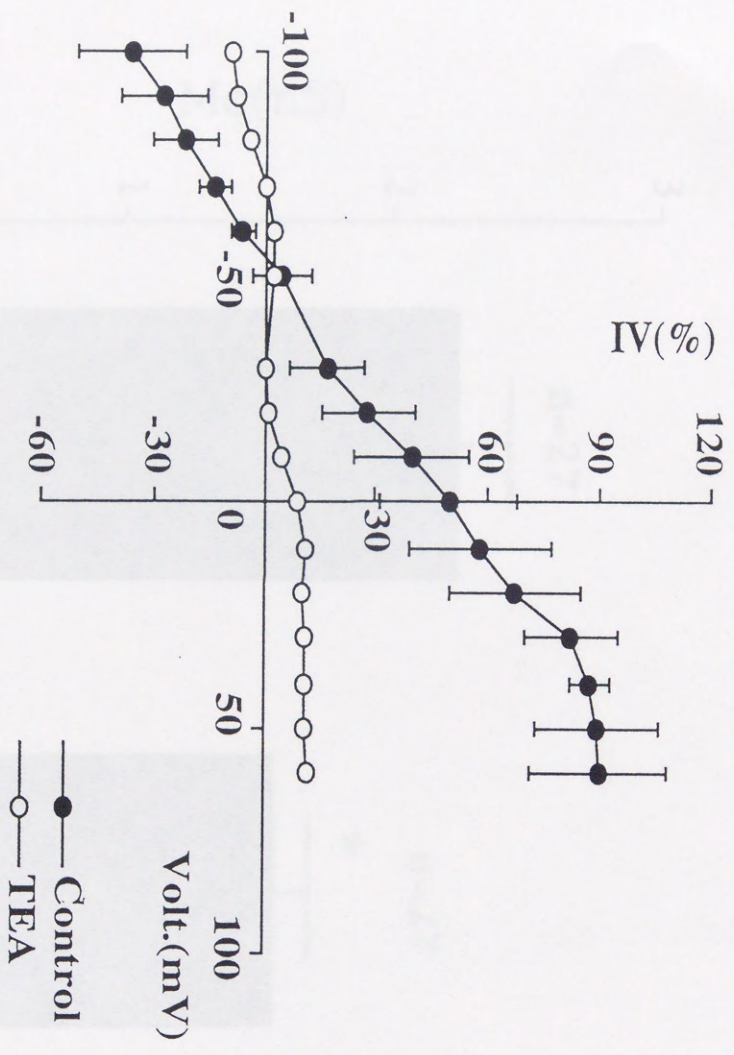
a.



b.

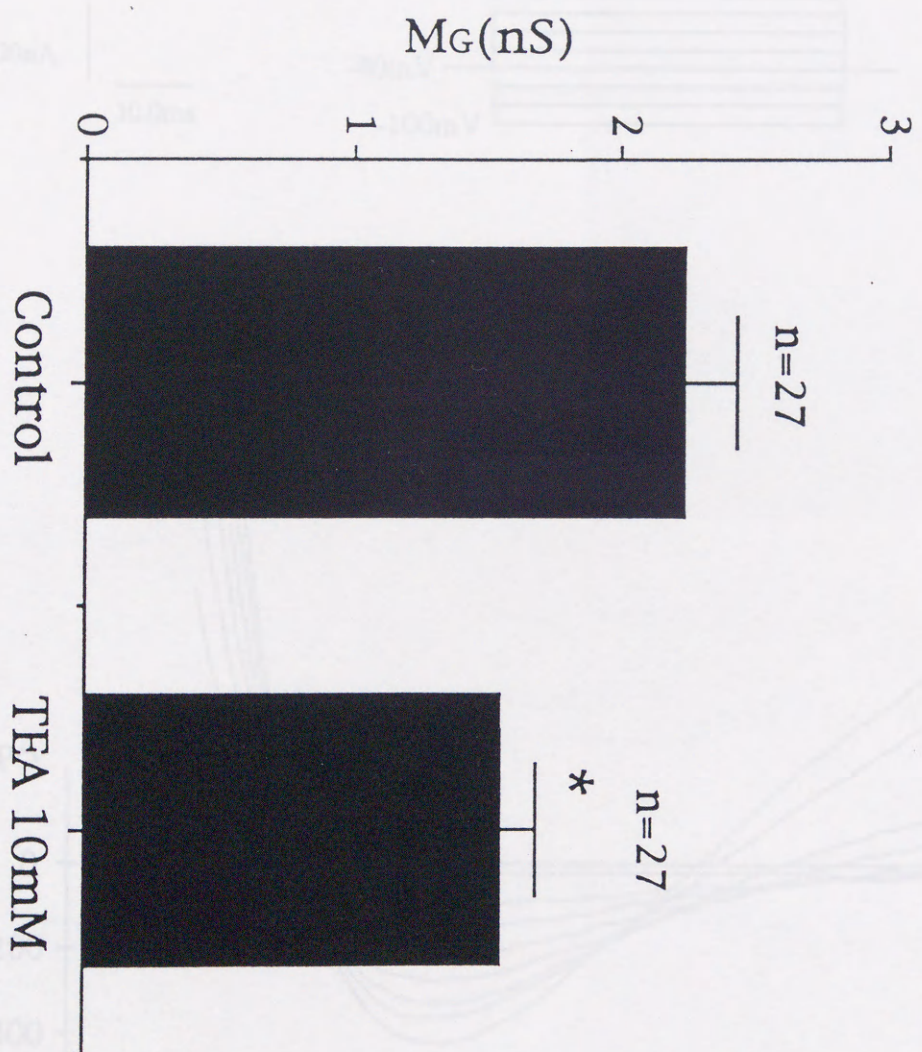








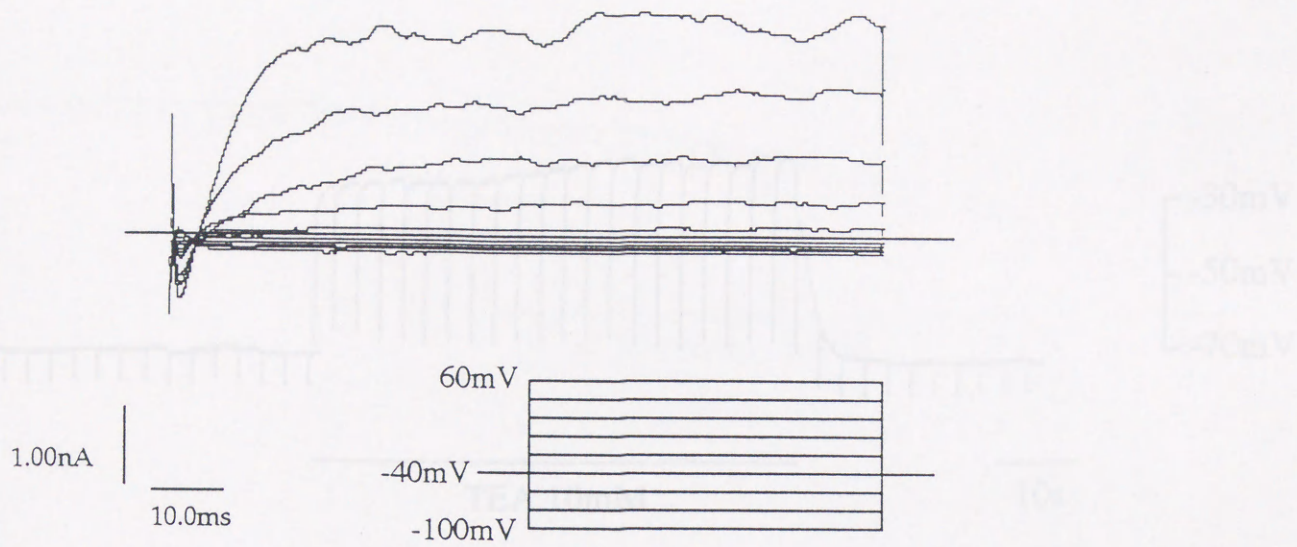
# Membrane conductance



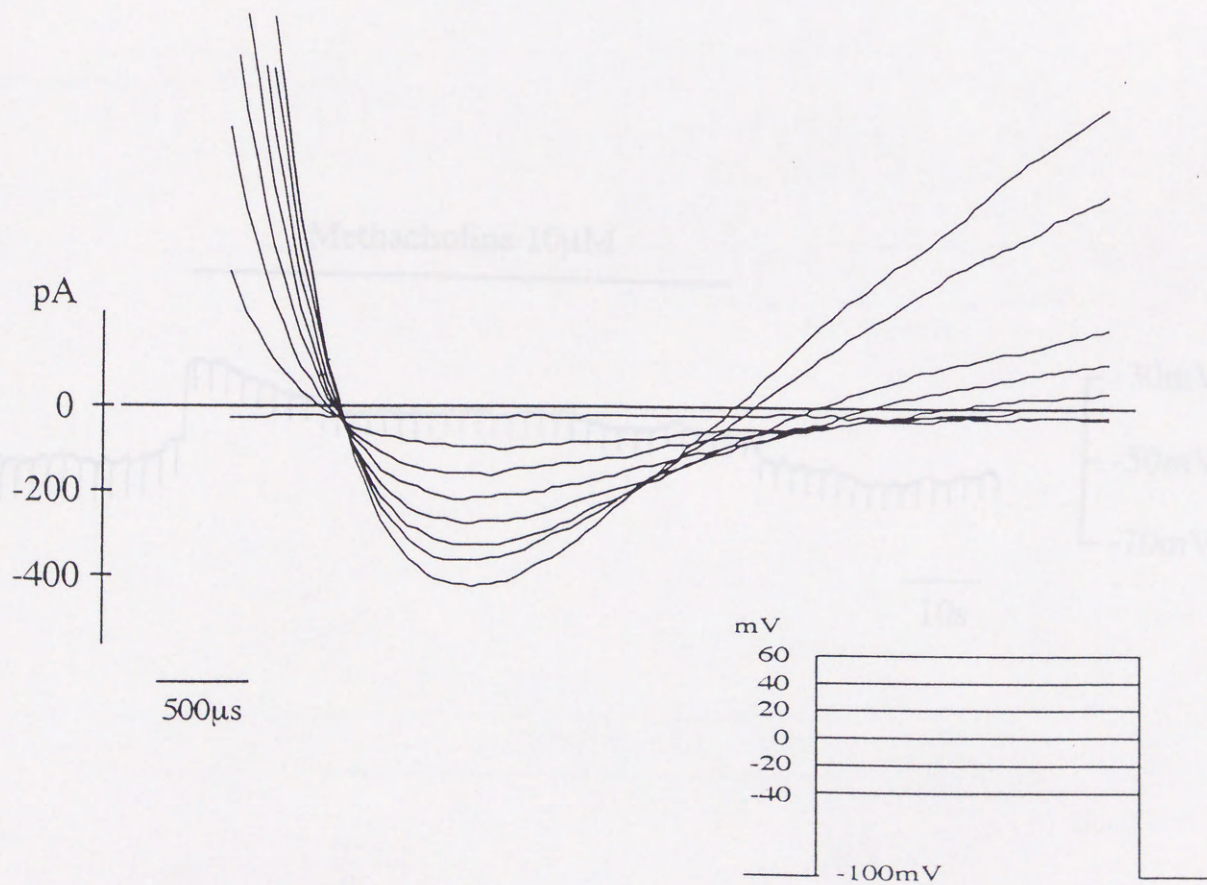
\* p<0.0002



a.

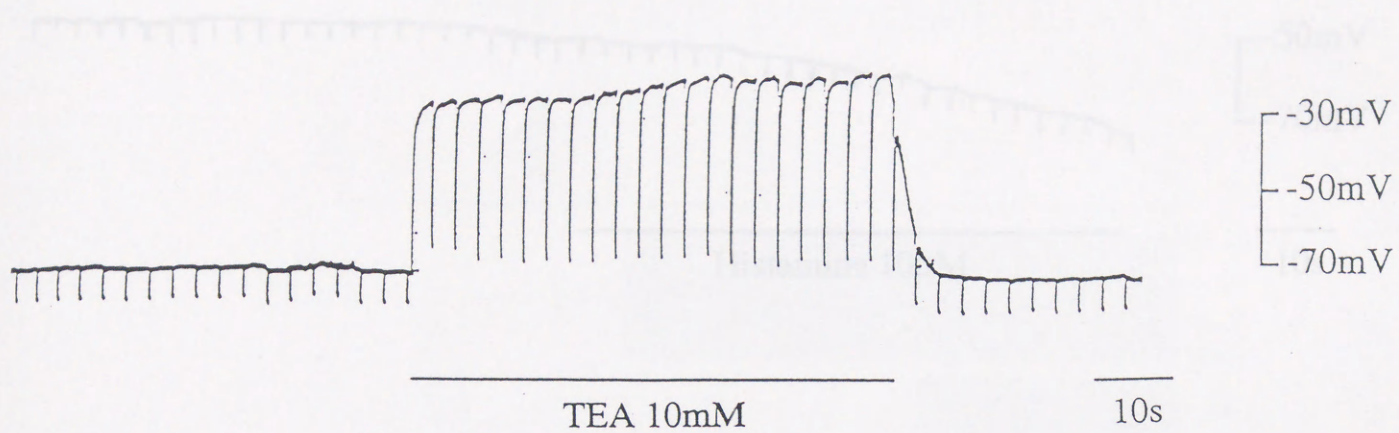


b.

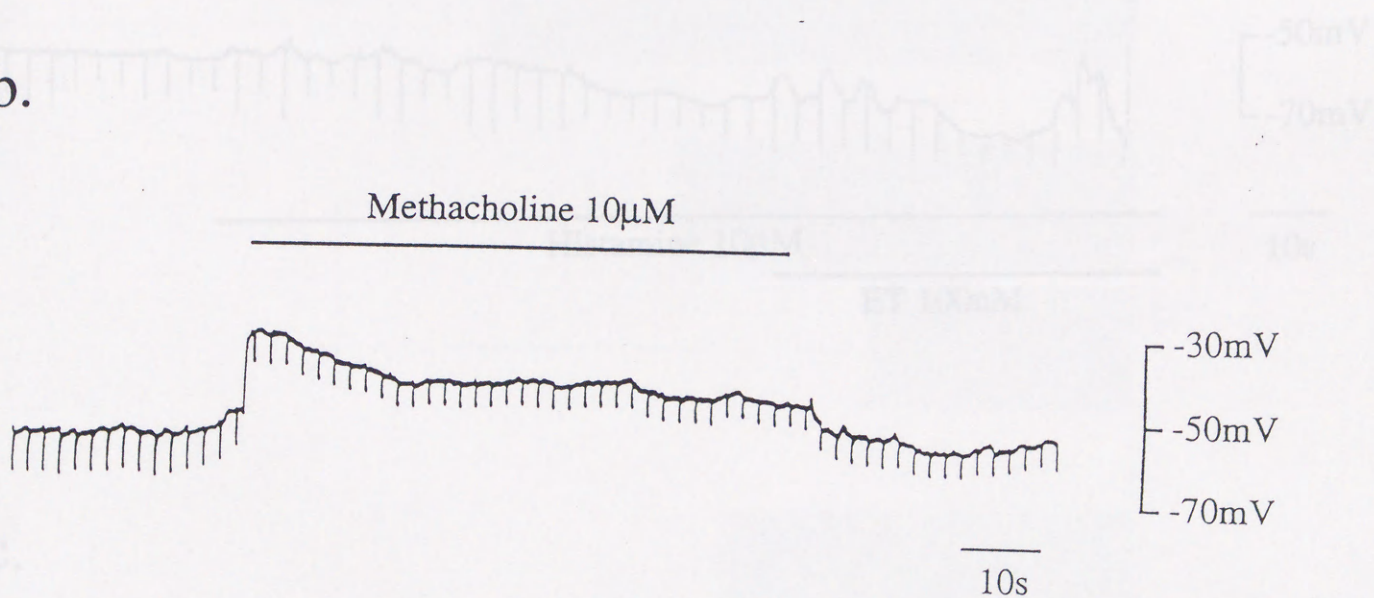




a.

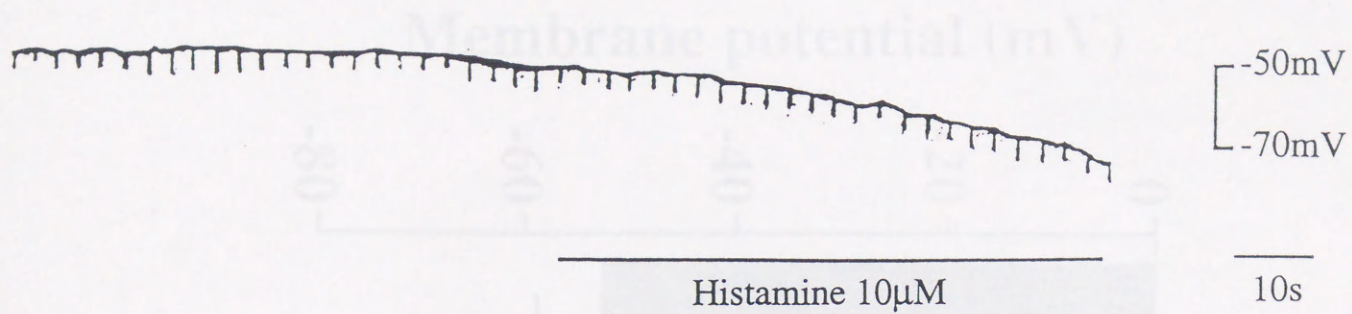


b.

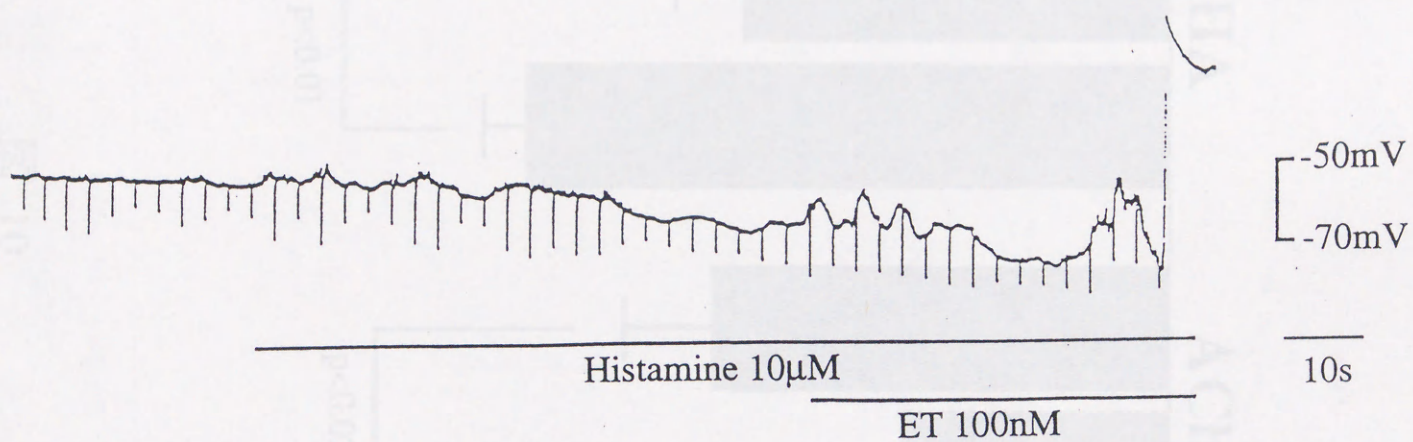




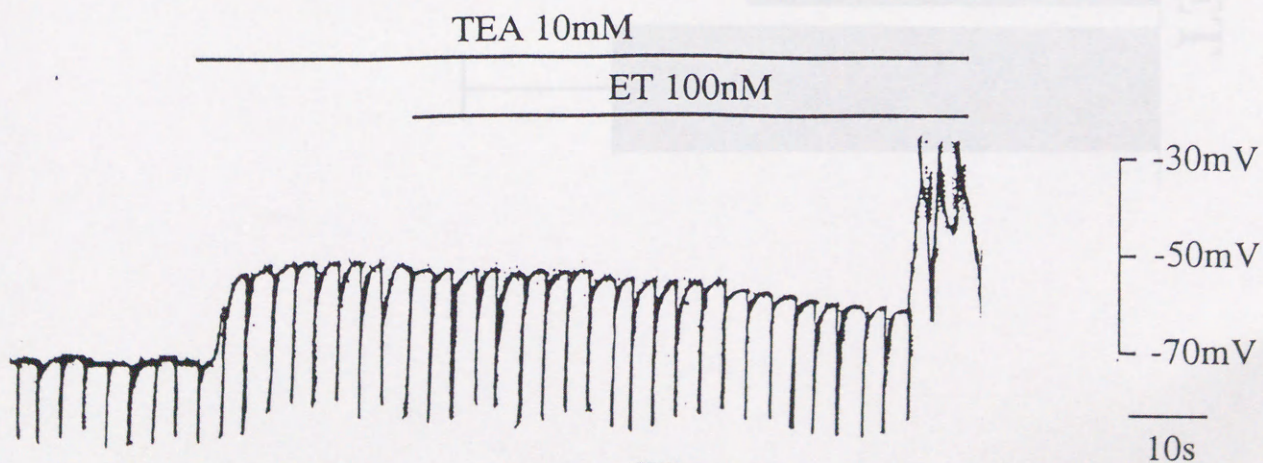
a.



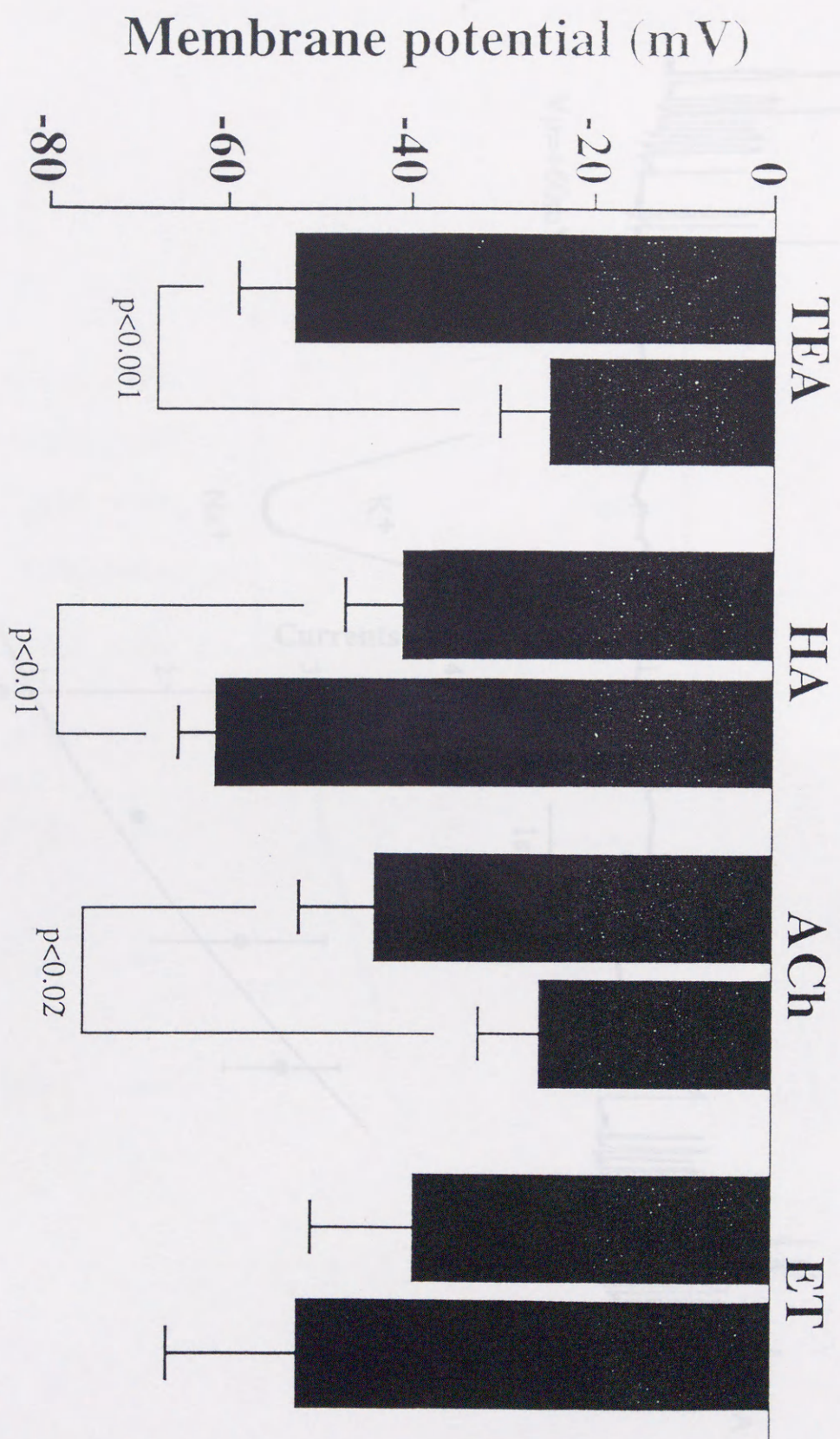
b.



c.

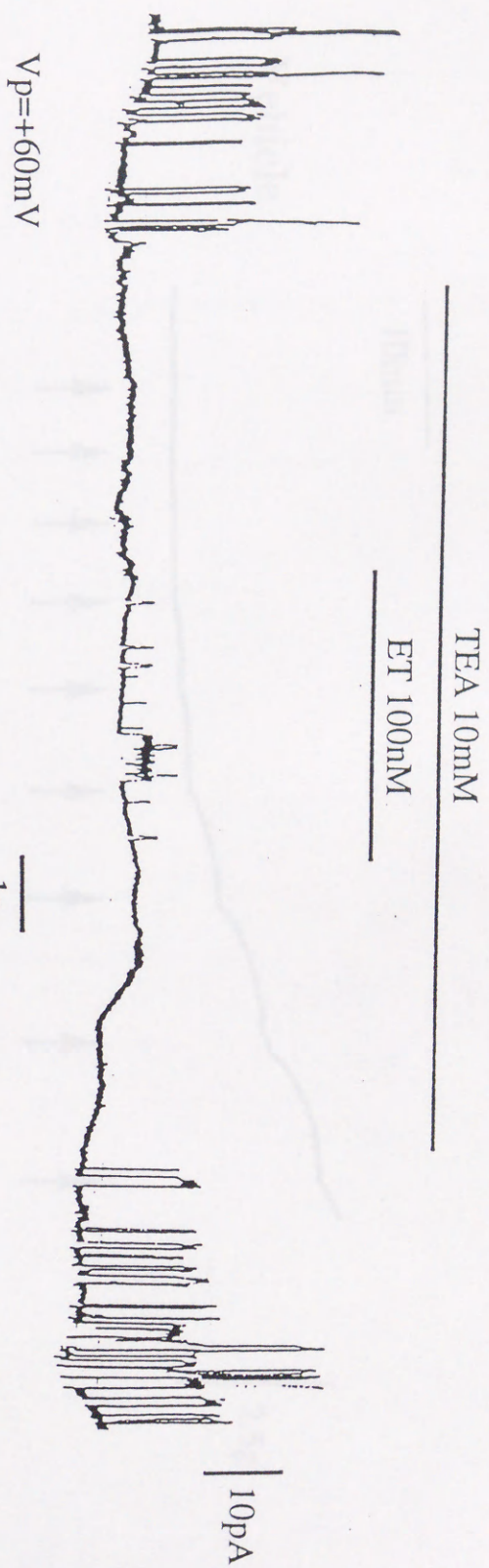




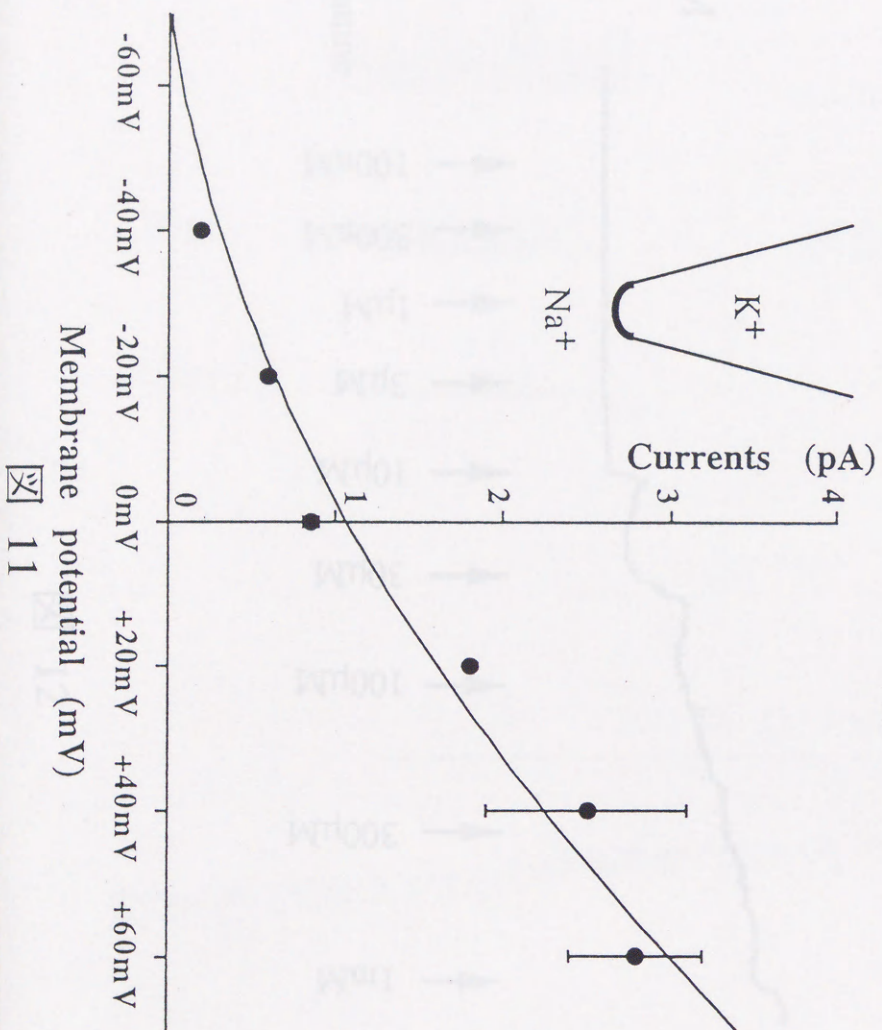




a.



b.





10min

Vehicle

2.5g

ET 100pM

2.5g

Histamine

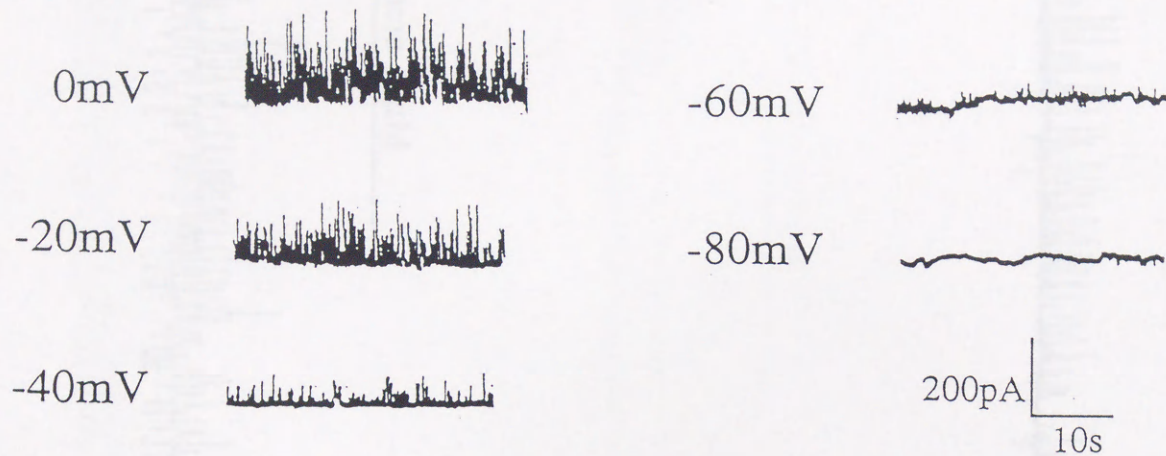
100nM →  
300nM →  
1μM →  
3μM →  
10μM →  
30μM →  
100μM →  
300μM →  
1mM →



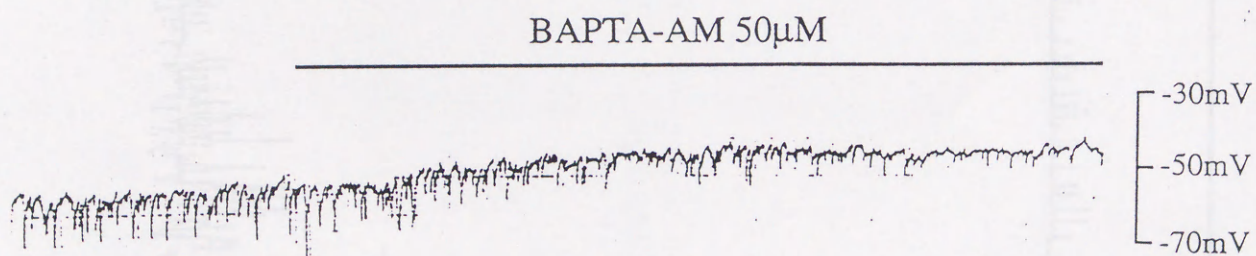
a.



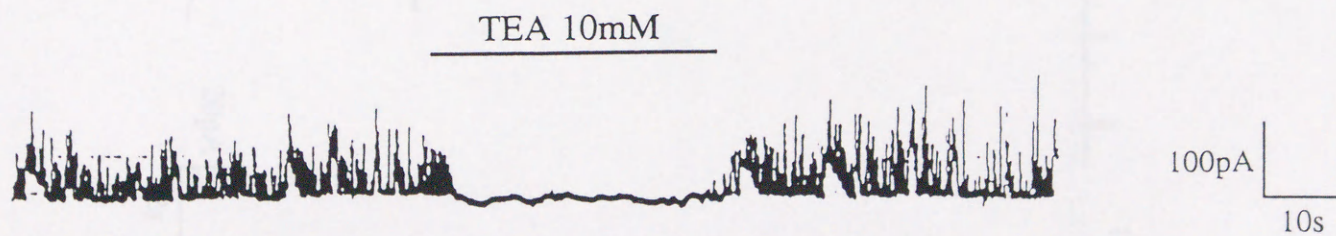
b.



c.

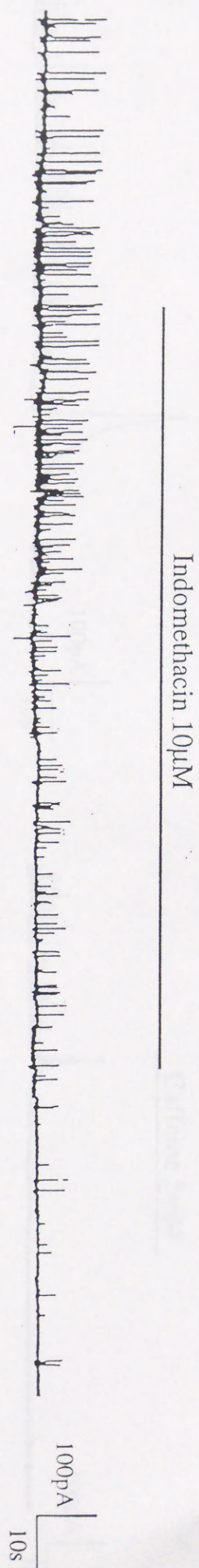


d.

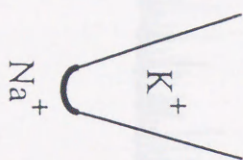




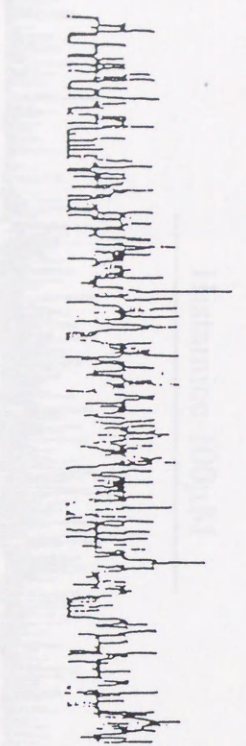
a.



b.



Indomethacin 10 $\mu$ M



TEA 5mM





a.

Carbachol 100 $\mu$ M



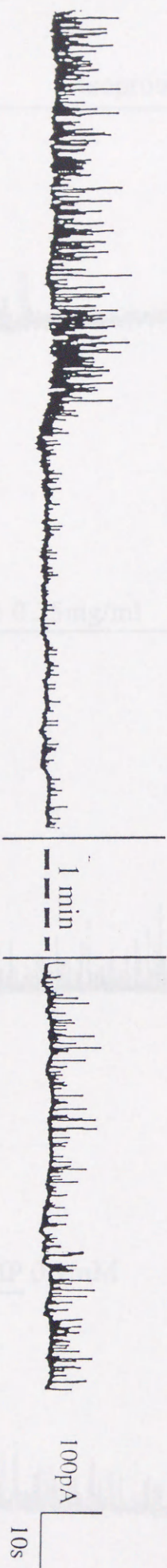
b.

Caffeine 5mM



c.

Ionomycin 1 $\mu$ M



d.

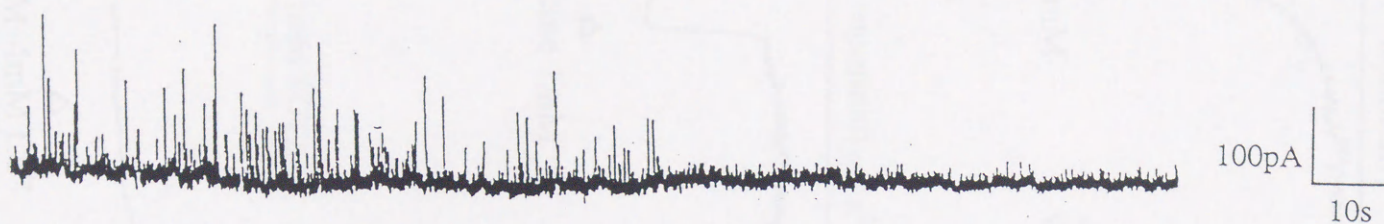
Histamine 100 $\mu$ M





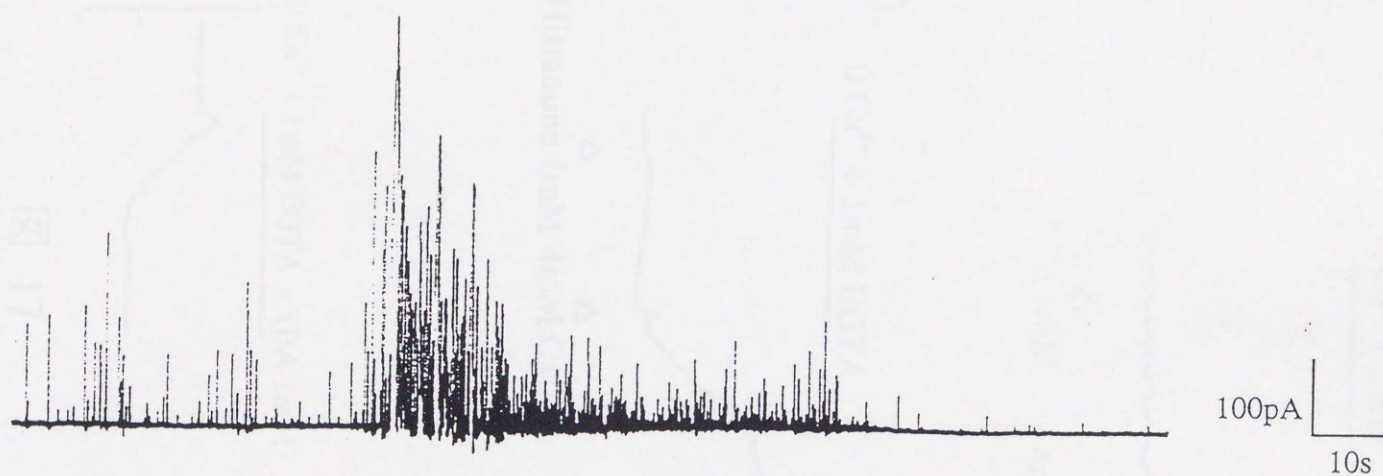
a.

Isoproterenol 10 $\mu$ M



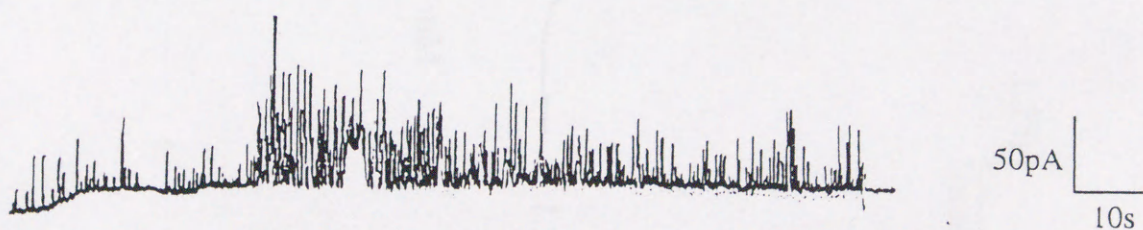
b.

Aminophylline 0.25mg/ml



c.

IBMX 1mM + CPT-cAMP 0.1mM

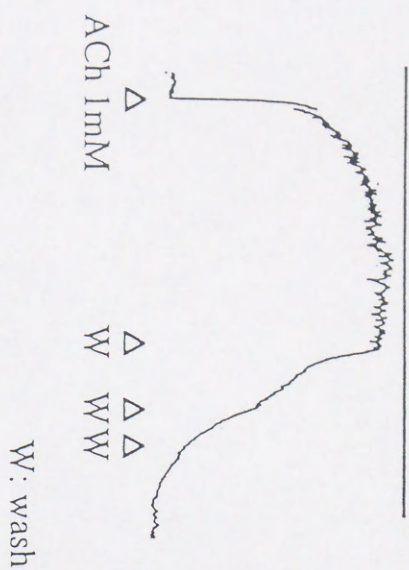




a.

(i).

nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free



(ii).

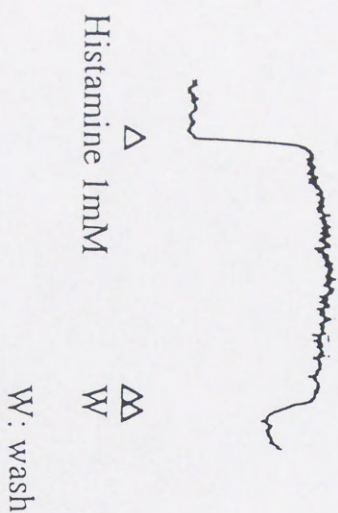
0  $\text{Ca}^{2+}$  + 1mM EGTA



b.

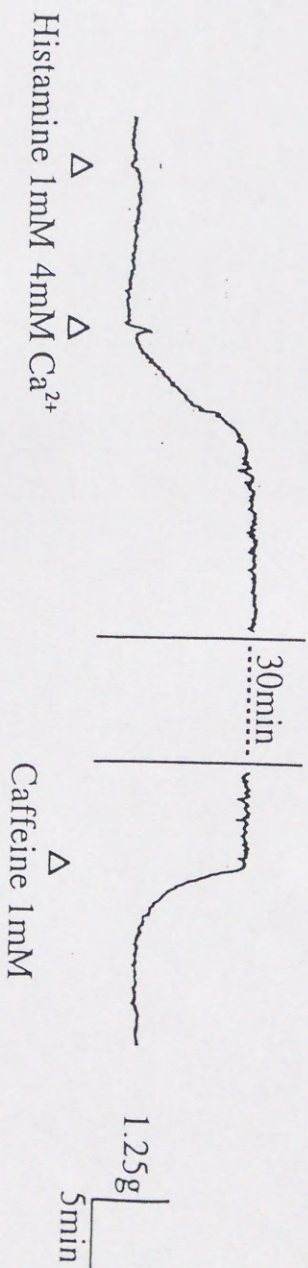
(i).

nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free



(ii).

0  $\text{Ca}^{2+}$  + 1mM EGTA



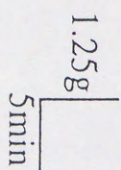
Caffeine 1mM

c.

0  $\text{Ca}^{2+}$  + 1mM EGTA



0  $\text{Ca}^{2+}$  + 1mM EGTA + TEA 1mM



TEA 1mM 4mM  $\text{Ca}^{2+}$







